

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA

**Eliminação do vírus do mosaico  
da macieira (ApMV) através da  
cultura de meristemas**

**ANDRÉ BARPP**

**ORIENTADOR: Enio Luiz Pedrotti**  
**SUPERVISOR: Gilmar Barcelos Kuhn**

Florianópolis, junho de 1996

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA

Eliminação do vírus do mosaico da macieira (ApMV)  
através da cultura de meristemas.

ANDRÉ BARPP



UFSC-BU

Relatório de Estágio livre de  
Conclusão de Curso, realizado no  
CNPUV/EMBRAPA, apresentado  
como requisito parcial para  
obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo pela UFSC.

Orientador: Enio Luiz Pedrotti  
Supervisor: Gilmar Barcelos Kuhn

Florianópolis, junho de 1996.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. APRESENTAÇÃO .....</b>                                  | <b>7</b>  |
| 1.1. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....                           | 8         |
| 1.2. HISTÓRICO DA EMPRESA .....                               | 8         |
| <b>2. INTRODUÇÃO .....</b>                                    | <b>11</b> |
| <b>3. PRINCIPAIS VIROSES .....</b>                            | <b>13</b> |
| 3.1. APPLE CHLOROTIC LEAF SPOT (ACLSV) .....                  | 13        |
| 3.1.1. SINTOMAS .....   | 13        |
| 3.1.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE .....                           | 14        |
| 3.2. APPLE RUBBERY WOOD .....                                 | 14        |
| 3.2.1. SINTOMAS .....   | 14        |
| 3.2.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE .....                           | 15        |
| 3.3. APPLE MOSAIC (APMV) .....                                | 15        |
| 3.3.1. SINTOMAS .....   | 15        |
| 3.3.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE .....                           | 16        |
| 3.4. APPLE FLAT LIMB (AFLV) .....                             | 16        |
| 3.4.1. SINTOMAS .....   | 17        |
| 3.4.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE .....                           | 17        |
| 3.5. APPLE STEM PITTING (ASPV) .....                          | 17        |
| 3.5.1. SINTOMAS .....   | 18        |
| 3.5.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE .....                           | 18        |
| 3.6. APPLE STEM GROOVING (ASGV) .....                         | 18        |
| 3.6.1. SINTOMAS .....   | 19        |
| 3.6.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE .....                           | 19        |
| 3.7. APPLE GREEN CRINKLE (GVC) .....                          | 19        |
| 3.7.1. SINTOMAS .....   | 20        |
| 3.7.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE .....                           | 20        |
| <b>4. MÉTODOS UTILIZADOS PARA ELIMINAÇÃO DE VIROSES .....</b> | <b>22</b> |
| 4.1. TERMOTERAPIA .....                                       | 23        |
| 4.2. CULTURA DE MERISTEMAS .....                              | 25        |
| <b>5. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE VIROSES .....</b>                | <b>26</b> |
| 5.1. DIFUSÃO DUPLA EM AGAR .....                              | 27        |
| 5.2. MICROPRECIPITAÇÃO .....                                  | 28        |
| 5.3. AGLUTINAÇÃO DE LÁTEX .....                               | 29        |
| 5.4. ELISA .....  | 30        |
| 5.4.1. DAS (DOUBLE ANTIBODY SANDWICH) .....                   | 32        |
| 5.4.2. PAS (PROTEIN A SANDWICH) .....                         | 33        |
| 5.4.3. TAS (TRIPLE ANTIBODY SANDWICH) .....                   | 33        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.5. PLANTAS INDICADORAS .....   | 35        |
| <b>6. PERSPECTIVAS DE EXPERIMENTOS.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>7. EXTRAÇÃO DE MERISTEMAS DE DIFERENTES TAMANHOS PARA<br/>ELIMINAÇÃO DO VÍRUS DO MOSAICO DA MACIEIRA.....</b> | <b>40</b> |
| 7.1. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 40        |
| 7.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 45        |
| <b>8. ISOLAMENTO <i>IN VITRO</i> DE PONTEIROS E SEGMENTOS NODAIS.....</b>  | <b>50</b> |
| 8.1. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 51        |
| 8.2. RESULTADOS .....  | 56        |
| <b>9. CONCLUSÃO PARCIAL DOS EXPERIMENTOS.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>11. BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>62</b> |
| ANEXO I.....   | 66        |
| <i>METODOLOGIA DO TESTE DAS (ELISA)</i> .....  | 66        |
| 1- ANTICORPO (IGG).....  | 66        |
| 2- AMOSTRA.....  | 66        |
| 3- CONJUGADO.....  | 67        |
| 4- SUBSTRATO .....   | 67        |
| <i>TAMPÕES:</i> .....  | 67        |
| ANEXO II.....  | 69        |
| <i>METODOLOGIA DA INOCULAÇÃO DE VÍRUS EM PLANTAS HERBÁCEAS<br/>INDICADORAS.</i> .....                            | 69        |
| TAMPÃO DE EXTRAÇÃO:.....   | 69        |



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Sintomas mais característicos das doenças provocadas pelos vírus: A- Apple chlorotic leaf spot; B- Apple rubbery wood; C- Apple mosaic; D- Apple flat limb; E- Apple stem pitting; F- Apple stem grooving; G- Apple green crinkle. ....   | 21 |
| Figura 2: Representação gráfica do Teste de Difusão Dupla em Agar, Conforme Rivera (1987), sendo os paratopos das imunoglobulinas representados por A, B, C e D, e os epitopos dos antígenos, por a, b, c e d. Tipos de reações: 1- Identidade entre os epitopos; 2- Parcial identidade entre os mesmos e 3- Não identidade. .... | 27 |
| Figura 3: Representação gráfica do Teste de Microprecipitação, conforme Fribourg & Nakashima (1981).....  | 28 |
| Figura 4: Representação gráfica do Teste de Aglutinação de Látex, conforme Fribourg & Nakashima (1981). A- Sensibilização das esferas de látex com imunoglobulinas; B- Reação serológica do látex sensibilizado com os antígenos homólogos.....   | 29 |
| Figura 5: Placa plástica de microtitulação utilizada como suporte sólido no Teste ELISA.  | 31 |
| Figura 6: Material utilizado para a realização do Teste ELISA. ....   | 32 |
| Figura 7: Representação gráfica de testes Elisa: DAS (double antibody sandwich); PAS (protein A sandwich); TAS (triple antibody sandwich).....  | 34 |
| Figura 8: Inoculação mecânica de vírus em plantas novas de pepino ( <i>Cucumis sativus</i> ). ..  | 37 |
| Figura 9: Ramo de 'Gala' infectado com o ApMV, coletado em Vacaria. ....  | 41 |
| Figura 10: Segmentos dos ramos infectados, utilizados na assepsia e extração. ....  | 41 |
| Figura 11: Desenho esquemático das etapas que envolvem a metodologia da Cultura de Meristemas para a eliminação de viroses. ....  | 44 |
| Figura 12: Detalhe das contaminações ocorridas com maior frequência no isolamento de meristemas. ....   | 46 |
| Figura 13: Taxa de contaminação dos diferentes tamanhos de meristemas extraídos dos ramos das cultivares Gala e Golden Delicious. ....  | 46 |
| Figura 14: Porcentagem dos diferentes tamanhos de meristemas extraídos que se diferenciaram em roseta e eixo caulinar.....  | 48 |
| Figura 15: Início da regeneração da planta, ocorrendo primeiro a diferenciação em roseta foliar.....  | 49 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 16: Segmentos dos ramos coletados que foram induzidos ao enraizamento e brotação, sendo que em muitas gemas ocorreu a produção de flores..... | 50 |
| Figura 17: Detalhe das mudas de ‘Gala’ infectadas com ApMV em Câmara de Termoterapia.....  | 52 |
| Figura 18: Isolamento <i>in vitro</i> do ponteiro extraído da muda de ‘Gala’, proveniente da Termoterapia.....                                       | 54 |
| Figura 19: Desenho esquemático das etapas que envolvem a metodologia da Cultura de Ponteiros provenientes da Termoterapia. ....                      | 55 |
| Figura 20: Forte oxidação, provocando amarelecimento e escurecimento do meio de cultura e explante.....  | 58 |

## **LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Lista de algumas viroses da macieira com as respectivas temperaturas e períodos de exposição à termoterapia. ....   | 24 |
| Tabela 2: Relação de viroses da macieira que são detectadas com eficiência pelo método ELISA. ....  | 31 |
| Tabela 3: Viroses da macieira detectadas por plantas indicadoras herbáceas, lenhosas em casa de vegetação e à campo, com os respectivos número de repetições necessárias para o sucesso do teste, temperatura ideal para o desenvolvimento dos sintomas e período necessário para o aparecimento dos sintomas. .... | 36 |
| Tabela 4: Número de meristemas extraídos, isolados e contaminados das cultivares Gala 28, Golden 21 e 12 com seus respectivos tamanhos de meristemas.....   | 45 |
| Tabela 5: Número de meristemas isolados que se diferenciaram em roseta foliar e eixo caulinar, para as cultivares Gala 28, Golden 12 e 21. ....   | 47 |
| Tabela 6: Crescimento das brotações das plantas de ‘Gala’, infectadas com o ApMV, submetidas à termoterapia, durante 25 dias.....   | 56 |
| Tabela 7: Taxas de contaminação e oxidação <i>in vitro</i> dos segmentos nodais e ponteiros extraídos de plantas de ‘Gala’ infectadas com ApMV, submetidas à termoterapia.....  | 57 |

## 1. APRESENTAÇÃO

Com o presente relatório, pretende-se descrever as atividades desenvolvidas durante o período de Estágio Curricular.

O estágio foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, no Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (EMBRAPA/CNPUV), localizado na cidade de Bento Gonçalves no estado do Rio Grande do Sul, no período de 10/01/96 à 1/03/96.

Neste período, desenvolveu-se trabalhos de eliminação de vírus em plantas de macieira, através de termoterapia *ex vitro*, *in vitro* e cultura de meristemas. Sendo assim, o objetivo principal do estágio foi de estudar estas técnicas, juntamente com a realização de experimentos utilizando as mesmas.

Destes experimentos, não serão possíveis obter resultados finais para serem mostrados no relatório e apresentação, pois necessita-se de um prazo médio de 6-8 meses para que ocorram o crescimento e desenvolvimento das plantas para posteriormente realizar testes de detecção de virose. Este período por sua vez é maior que o cedido para estágio. Porém mesmo após este período continuarão os acompanhamentos.

Decidiu-se pesquisar eliminação de vírus em macieira no Centro Nacional de Uva, porque este Centro realiza a eliminação de vírus da videira, através da Termoterapia aliada à cultura de tecidos vegetais *in vitro*. Neste também realizam-se testes de detecção de viroses através dos métodos ELISA e indexagem em plantas indicadoras. A metodologia utilizada para a videira tanto para a cultura de tecidos como para os testes de detecção é muito semelhante à utilizada para macieira, diferindo somente na composição do meio de cultura e de alguns tampões utilizados na detecção do vírus.

Para o melhor andamento do estágio, bem como dos experimentos, foram necessárias a realização de algumas atividades, as quais serão descritas no próximo item.

## **1.1. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

Durante o período do estágio foram realizadas as seguintes atividades:

- Acompanhamento e realização de testes sorológicos para detecção de viroses.
- Coleta de material vegetativo infectado com o vírus do Mosaico da macieira (Apple mosaic virus-ApMV), na Estação da EMBRAPA em Vacaria.
- Preparação de meio de cultura.
- Introdução do material vegetativo *in vitro* através da extração de meristemas e ponteiros.
- Termoterapia em vaso de mudas da cultivar Gala (*Malus domestica*) infectadas com o ApMV e posterior extração de ponteiros e segmentos nodais.
- Inoculação do ApMV em plantas indicadoras herbáceas.

## **1.2. HISTÓRICO DA EMPRESA**

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), é uma empresa pública vinculada ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Criada em 7 de dezembro de 1972, através da Lei N° 5.851, instalou-se em Brasília no dia 26 de abril de 1973, assumindo as funções do Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária.

A EMBRAPA compreende a administração superior, em Brasília e mais 37 Centros de Pesquisa.

Em 1975, no dia 26 de agosto, através da Deliberação N° 037/75, definiu a criação da Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual - UEPAE de Bento Gonçalves que em 5 de março de 1985 passou a se chamar de Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (CNPUV).

O CNPUV conta com 4 bases físicas: Sede em Bento Gonçalves, Campo Experimental de Garibaldi em Garibaldi, Estação Experimental de Vacaria e Estação Experimental de Jales, SP.

Este centro tem como missão institucional, “gerar e promover conhecimento e tecnologia para o desenvolvimento sustentado do Complexo Agro-industrial Vitinícola Nacional, bem como de Fruteiras de Clima Temperado da região Sul, em benefício da sociedade”.

Em 20 anos de pesquisa o CNPUV obteve muitos resultados positivos gerando muitas tecnologias, dos quais os mais importantes são descritos a seguir:

- Produção e distribuição de material vegetativo livre de vírus constituído de estacas e barbados de porta-enxertos e enxertos e mudas de produtoras.

- Produção e distribuição da levedura EMBRAPA 20B.

- Produção e distribuição do fungo do gênero *Trichoderma* para o controle da podridão de raízes de macieira.

- Recomendação de variedades de uva para vinhos finos como Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay, Gewurztraminer, Riesling Itálico, Malvasias e outras; para vinhos comuns como Seyve Villard 5276 e Couderc 13; para uva de mesa como Vênus, Dona Zilá e Tardia de Caxias e para suco as promissoras H 65.9.14, Alwood e seleções clonais mais produtivas da ‘Concord’.

- Controle integrado das principais doenças fúngicas da videira e das fruteiras.

- Método de controle da contaminação industrial do suco de uva por leveduras indesejáveis, através da água em evaporação.

- Recomendação de práticas para controle das podridões de maçã em pós-colheita.

- Emprego racional da cama de aviário na adubação dos vinhedos.

→ Adaptação do processo de maceração carbônica para elaboração de vinhos tintos.

→ Geração de informações para recomendações sobre manejo do solo e tratamentos culturais.

→ Consultoria e parceria com o setor vitivinícola brasileiro na definição do Código Vitivinícola do MERCOSUL, contribuindo com definição de regiões vitivinícolas, uso de indicações geográficas, definição de produtos, práticas enológicas e definição de padrões de identidade e qualidade dos produtos vitivinícolas.

→ Controle biológico de *Botrytis* em Morangueiro.

## 2. INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus sp.*) possui como Centro de Origem, a região entre o Cáucaso e o leste da China, tendo o desenvolvimento das espécies atuais começado há 20.000 anos.

Segundo Kutzelnigg & Silbereisen, citados em Manual da Cultura da Macieira (1986), há relatos da cultura da macieira desde a antiguidade através de publicações de Marcus P. Catto (200 a.C) “De Agricultura” e documentos como, “História Naturalis” de C. Plinius II e “Rei Rusticae” de L. I. M. Columella, ambos datam de 100 d.C.

No Brasil o início da cultura ocorreu em 1926 no município de Valinhos em São Paulo, através da introdução de plantas da cultivar Ohio Beauty.

Já no sul do Brasil, iniciou em 1940 no município de Bom Jardim da Serra em Santa Catarina e 1948 em Caxias do Sul no Rio Grande do Sul.

A cultura da macieira começou se expandir em Santa Catarina a partir da década de 70 com a criação do Projeto de Fruticultura de Clima Temperado (PROFIT). Através deste projeto muitos agricultores foram incentivados a cultivar a macieira, começando a produção de forma extensiva com baixa produtividade. Com o passar dos anos, através de introduções de técnicas de produção européia, através de suas adaptações e de avanços nas pesquisas, começou a grande expansão, mudando o panorama de pequenos agricultores para médios e grandes produtores e grandes empresas que empregam alta tecnologia aumentando a produtividade.

Assim ocorreu uma grande expansão de área plantada, principalmente em Santa Catarina, de 3.150 ha em 1975 para mais de 13.600 ha, que juntamente com o aumento da produtividade tornou o Brasil auto suficiente em 1990.



Santa Catarina tornou-se o maior produtor nacional com 60% da produção, seguido por Rio Grande do Sul com 30%.

Devido a esta enorme expansão imposta de maneira rápida, ocorreram problemas principalmente na qualidade das mudas produzidas pelos viveiristas. Estes aproveitando a grande demanda de mudas, deixaram de lado muitos cuidados que devem ser tomados para produzir mudas com alta qualidade.

Com isto grandes pomares apresentam-se em declínio de produção, devido a ocorrência de numerosas doenças, principalmente viroses, as quais chegam a diminuir a produção em até 50 %. Estas certamente foram disseminadas através da enxertia de mudas infectadas, as quais são propagadas vegetativamente, o que possibilita junto com a poda, a rápida multiplicação e disseminação do vírus..

Portanto vê-se grande importância na produção de mudas com alta qualidade que sejam livres de vírus, pois como foi visto pode aumentar a produtividade em até 50 %.

Muitas plantas matrizes de viveiristas e de Empresas estão infectadas com diversas viroses. Em muitas destas não é possível observar sintomas das viroses devido ao estado de latência do vírus.

Técnicas como a Termoterapia e Cultura de meristemas são capazes de eliminar o vírus das mudas infectadas. E ainda a Micropropagação *in vitro* aliada a estas técnicas pode produzir mudas de alta qualidade isenta de vírus e de qualquer outro patógeno.

Nas páginas que seguem serão abordadas as principais viroses da macieira, os métodos de eliminação de vírus, os métodos de detecção de viroses e as etapas iniciais dos experimentos de extração de diferentes tamanhos de meristemas e de extração de ponteiros e segmentos nodais, provenientes de termoterapia em vaso de plantas da cultivar Gala (*Malus domestica*).

### 3. PRINCIPAIS VIROSES

A partir da década de 80 começou a identificação de várias viroses e micoplasmoses no Sul do Brasil que causavam declínio e baixa produtividade. Segundo Leite & Bleicheir (1993), as principais viroses e micoplasmoses encontradas em Santa Catarina são: Apple chlorotic leaf spot (Vírus latente da clorose foliar), Apple rubbery wood (Lenho mole, micoplasmoses), Apple mosaic (Vírus do mosaico da macieira), Apple flat limb, Apple stem pitting, Apple stem grooving e Green crinkle.

#### 3.1. APPLE CHLOROTIC LEAF SPOT (ACLSY)

O vírus tem sido observado desde 1959 na Inglaterra e América do Norte, ocorrendo em cultivares e porta-enxertos (Mink, 1989a). No Brasil foi detectado em 1972 no estado de São Paulo, ocorrendo na cultivar ‘Ohio Beauty’ e porta-enxertos ‘M-7’, ‘MM-104’, ‘MM-109’ e ‘Northern Spy’ (Bleicher *et al*, 1986).

##### 3.1.1 SINTOMAS

Em *Malus platycarpa*, provoca manchas cloróticas nas folhas (Bleicher *et al*, 1986) e diminuição de tamanho com distorção assimétrica da folha (Mink, 1989a), Figura 1A. No fruto causa diminuição de tamanho, observando sobre a epiderme manchas de “russeting” em forma de anéis (Bleicher *et al*, 1986), causando assim depreciação do produto.

### **3.1.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE**

Não pode ser transmitido por insetos e raramente passa naturalmente de uma planta para outra. A principal fonte de transmissão é a enxertia, utilizando material infectado.

O controle pode ser feito a partir da utilização de material isento de vírus. A cultura de meristemas juntamente com a termoterapia são eficientes na eliminação do vírus (Mink, 1989a).

Segundo Hansen e Lane citados por Mink, (1989a), a aplicação de 10 a 40  $\mu\text{M}$  de ribavirin (1-  $\beta$ -D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide) em meio de cultura por 8 semanas pode eliminar o vírus das brotações.

### **3.2. APPLE RUBBERY WOOD**

Doença conhecida como lenho mole, provavelmente causada por um micoplasma ( Leite & Bleicher, 1993; Ogawa, 1991). Foi observada pela primeira vez na cultivar 'Lord Lambourne' na Inglaterra em 1935. Esta cultivar é uma das mais sensíveis servindo como planta indicadora. Outras cultivares, também são sensíveis: 'Gala', 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Jonathan' e 'Darmouth Crab'.

### **3.2.1. SINTOMAS**

Alta flexibilidade do caule e dos ramos, resultado da ausência de lignificação dos vasos do xilema (Minoui et al, 1980) citado por Ogawa (1991). Os ramos não suportam o próprio peso e se curvam, Figura 1B. Causa redução do vigor e diminuição da produtividade.

Os sintomas iniciais podem ocorrer em plantas novas a partir do terceiro ano após infecção, podendo posteriormente produzir ramos normais.

### **3.2.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE**

A transmissão ocorre através da enxertia e da utilização de material vegetal infectado. Não foi constatada a transmissão via insetos sugadores.

O principal controle é a utilização de mudas e material para propagação certificados isentos de vírus. Pode ser eliminado via termoterapia e cultura de meristemas.

## **3.3. APPLE MOSAIC (APMV)**

O mosaico da macieira é uma das viroses mais comum, ocorrendo em todas as regiões produtoras (Mink, 1989b; Ogawa, 1991). Foi introduzida no Brasil em 1950, através de mudas provenientes da Argentina (Bleicher *et al*, 1986).

### **3.3.1. SINTOMAS**

Os sintomas são principalmente observados nas folhas. Ocorre formação de numerosas e pequenas áreas cloróticas de coloração creme,

amarelo e branco, podendo ocorrer coalescência abrangendo quase toda folha (Bleicher *et al*, 1986), (Figura 1C). Pode provocar o desfolhamento e morte. O desfolhamento causa maior exposição dos frutos ao sol podendo queimá-los. Prejudica ainda o desenvolvimento dos frutos e das gemas de frutificação do ano seguinte (Ogawa, 1991).

Os sintomas são raramente encontrados nos frutos, somente quando a infecção é severa, em plantas de fruto vermelho, ocorrem variegações de coloração creme.

O ApMV pode reduzir a produtividade em até 50 %.

Segundo Mink (1989b), os sintomas podem ser severos em um ano e não em outro, dependendo da temperatura (quando alta), da maior exposição ao sol e do estado de latência do vírus.

### 3.3.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE

O ApMV não se transmite via semente. É transmitido principalmente através da enxertia e da poda (Ogawa, 1991).

Para controlar esta virose deve-se utilizar mudas certificadas isentas de vírus e eliminar todas as árvores que apresentarem os sintomas, para evitar a disseminação através da poda.

Segundo Posnette & Cropley, citados por Mink (1989b), o ApMV pode ser inativado em plantas novas se submetido à temperatura de 37°C durante 2 a 3 semanas.

Pepino (*Cucumis sativus*) e Sália (*Quenopodium quinoa*) podem ser utilizados como plantas herbáceas indicadoras, diminuindo o período necessário para o aparecimento dos sintomas. (Mink, 1989b)

### **3.4. APPLE FLAT LIMB (AFLY)**

Conhecido como vírus da deformação dos ramos. Identificado na Austrália em 1956. Esta virose não é muito comum devido ao estado de latência do vírus em muitas cultivares (Ogawa, 1991).

A cultivar Gravenstein é muito susceptível. Os sintomas também são verificados em plantas de marmelo e pêra (Fridlund & Waterworth, 1989).

#### **3.4.1. SINTOMAS**

Ocorrência de áreas achatadas e dispersas em ramos jovens que mais tarde se transformam em rachaduras, Figura 1D (Leite & Bleicher, 1993). Isto ocorre devido ao desenvolvimento indiferenciado das células do câmbio que produzem um tecido parenquimatoso.

Segundo Fridlund & Waterworth (1989), os sintomas não são verificados em folhas e frutos. Podem levar de 4 a 8 anos para se manifestar em plantas mais resistentes.

#### **3.4.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE**

Organismo patogênico indefinido transmitido através da enxertia.

Para evitar o aparecimento do vírus no pomar deve-se utilizar mudas certificadas isentas de viroses. A termoterapia e a cultura de meristemas são eficientes na eliminação deste vírus.

### **3.5. APPLE STEM PITTING (ASPV)**

O ASPV é um dos vírus latentes mais comuns nas cultivares comerciais de macieira. Seus sintomas foram verificados primeiramente em ‘Virginia Crab’. Por ser uma variedade muito susceptível, é utilizada como planta indicadora (Stouffer, 1989). Os sintomas também tem sido encontrados em ‘Red Delicious’ e ‘Monterey Country’.

#### **3.5.1. SINTOMAS**

Nos ramos causa formação de sulcos e ranhuras a baixo da casca, parando somente no ponto de enxertia (Leite & Bleicher, 1993). Quando severo, o revestimento da casca é espesso e duro com fissuras longitudinais, Figura 1E.

O ASPV pode causar declínio no crescimento, produção de frutos pequenos com ranhuras e russeting, conforme Posnette (1963) e Wood (1979) citados por Stouffer (1989).

#### **3.5.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE**

Vírus transmitido pela enxertia e poda. Os sintomas aparecem após 1 ano da inoculação (Ogawa, 1991).

Segundo Nemeth (1986) citado por Ogawa (1991) este vírus pode ser eliminado através da termoterapia (14-77 dias à 38°C) e da cultura de meristemas.

### **3.6. APPLE STEM GROOVING (ASGV)**

A doença que este vírus provoca também é chamada de Vírus latente clorótico. O ASGV, vírus tipo 2 da macieira sempre aparece associado com Apple stem pitting. E como nesta doença a ‘Virginia Crab’ se apresenta muito susceptível sendo utilizada como planta indicadora ( Welsh & van der Meer, 1989).

#### **3.6.1. SINTOMAS**

Os sintomas são dificilmente observados em cultivares comerciais de macieira, porém em ‘Virginia Crab’ provoca longos sulcos a baixo da casca. Desenvolve no ponto de enxertia uma linha marrom necrosada (Leite & Bleicher, 1993). Pode provocar encurvamento das folhas e declíneo de crescimento, Figura 1F.

#### **3.6.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE**

O ASGV é transmitido pela enxertia, através da utilização de material infectado.

O principal controle é a utilização de material certificado isento de viroses. A exposição de mudas à termoterapia ( 38°C por 30 dias) não tem sido eficiente na eliminação do vírus ( Welsh & van der Meer, 1989).



### **3.7. APPLE GREEN CRINKLE (GYC)**

Esta doença tem ocorrência no mundo inteiro, principalmente aqueles que utilizam a cultivar Granny Smith (Ogawa, 1991). Outras cultivares mais atacadas são a Golden Delicious, McIntosh e Northern Spy (Thomsen, 1989). Dentre estas, as cultivares Granny Smith e Golden Delicious são utilizadas como plantas indicadoras.

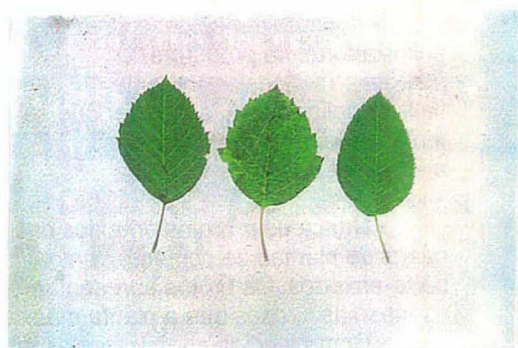
#### **3.7.1. SINTOMAS**

Os sintomas ocorrem principalmente nos frutos, provocando depressões que vão aumentando com o desenvolvimento dos mesmos, se transformando em rugas, Figura 1G (Leite & Bleicher, 1993). Os primeiros sintomas ocorrerem após algumas semanas do florescimento. Em algumas cultivares pode retardar o crescimento e o desenvolvimento da planta (Ogawa, 1991).

#### **3.7.2. TRANSMISSÃO E CONTROLE**

A transmissão do vírus ocorre através da enxertia.

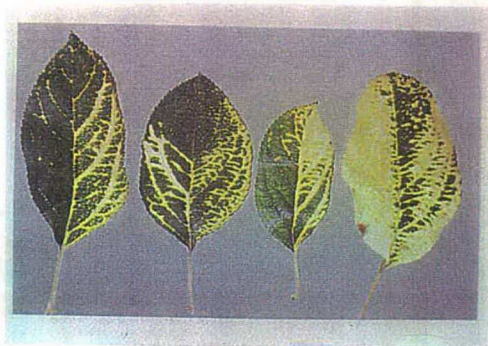
Pode ser controlado a partir da eliminação de árvores que apresentam os sintomas e utilização de mudas certificadas isentas de viroses.



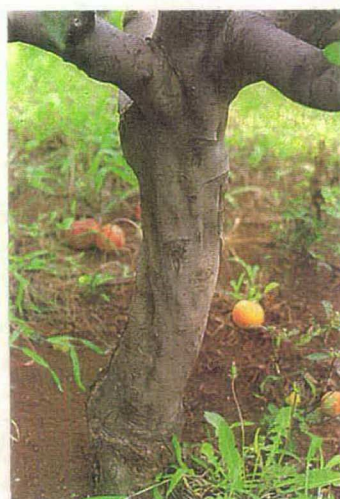
A



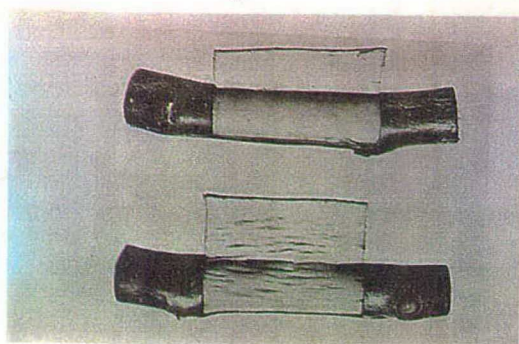
B



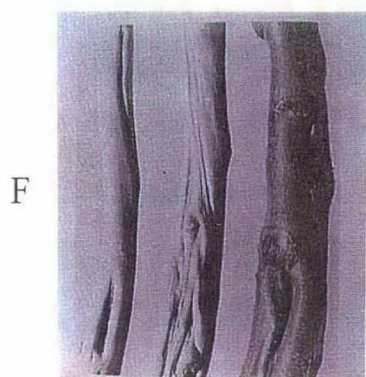
C



D



E



F



G

**Figura 1: Sintomas mais característicos das doenças provocadas pelos vírus: A- Apple chlorotic leaf spot; B- Apple rubbery wood (micoplasma); C- Apple mosaic; D- Apple flat limb; E- Apple stem pitting; F- Apple stem grooving; G- Apple green crinkle (Leite & Bleicher, 1993).**



## 4. MÉTODOS UTILIZADOS PARA ELIMINAÇÃO DE VIROSES

O sucesso da produção macieira e de todas as outras frutíferas está cada vez mais dependente da qualidade sanitária das mudas, principalmente devido ao aumento da concorrência de mercado. Neste aspecto as viroses são as principais doenças que prejudicam a qualidade das mudas e consequentemente do pomar, inviabilizando todo um investimento.

Com as técnicas de produção que se dispõe atualmente, praticamente já se chegou ao limite de produtividade e lucratividade. Muitos pomares atualmente encontram-se infectados por viroses que chegam a prejudicar a produtividade em até 50 %. Pois se utilizassem mudas isentas de viroses, a produtividade média de 25-30 t/ha passaria à ser de 50-60 t/ha, representando maior lucratividade.

Assim, atualmente a produção de mudas de propagação vegetativa só pode ser aceitável com a utilização de material vegetativo isento de viroses e de qualquer outro patógeno, garantindo a qualidade final das mudas que certamente produzirão mais.

Para isso existem algumas técnicas que possibilitam a eliminação de viroses das plantas, viabilizando a propagação vegetativa com qualidade. As técnicas são: Quimioterapia, Termoterapia e a Cultura de Meristemas. Dentre estas as mais importantes são a Termoterapia e a Cultura de Meristemas, pois garantem maior eficiência de eliminação.

## **4.1. TERMOTERAPIA**

Segundo Mendonça (s.d), a termoterapia foi utilizada pela primeira vez para a eliminação de vírus de plantas em 1923 por Wilbrink. Posteriormente a técnica foi melhor desenvolvida por Kunkel (1935).

A técnica se baseia no tratamento de mudas infectadas com vírus pelo calor, o qual impediria a multiplicação do vírus deixando-o mais lento que a multiplicação celular da planta, podendo as vezes levar à eliminação.

O tratamento pode ser com água ou com ar quente. Em água quente, utiliza-se ramos dormentes que permanecem curtos períodos sobre a exposição do calor, cerca de 30 minutos. Já em ar quente utiliza-se plantas que permanecem por maiores períodos, cerca de 2 a 5 semanas, dependendo da planta e do vírus (Fridlund, 1989). Para proceder o tratamento com ar quente utiliza-se câmaras, onde a temperatura, luminosidade, fotoperíodo e umidade são controlados.

Segundo Fridlund (1989), existem 2 métodos originais de termoterapia com ar quente. Um que cria somente um ambiente desfavorável para a multiplicação do vírus e outro que se utiliza de “brotações escapes” do hospedeiro para a enxertia. Destas brotações escapes se utilizaria somente o ápice do broto, aonde provavelmente, devido a multiplicação lenta do vírus, estaria isento do mesmo.

O método que se utiliza somente do tratamento pelo calor, possui alguns problemas como o reaparecimento dos sintomas após algum tempo do tratamento. Isto foi atribuído ao fato de não ser possível manter as raízes das plantas na mesma temperatura que a parte aérea, devido ao arrefecimento da terra pela evaporação da água, apresentando-se como uma área de escape para o vírus (Mendonça, s.d.).

Para solucionar este problema alguns pesquisadores, Thomson (1956), Quack (1957) e Gilford *et al* (1961), citados por Mendonça (s.d.), combinaram esta técnica com a extração de ponteiros (ápices), obtendo maior sucesso. Isto ocorre, porque o vírus em um ambiente inadequado se multiplica



mais lentamente que as células vegetais, não infectando o ápice, aonde apresenta, além da multiplicação constante de células, avascularização, dificultando ainda mais a infecção.

Yamaga & Munakata (1991), combinando as técnicas de cultura de meristemas com termoterapia eliminaram o apple stem grooving virus (SGV) de plantas da cultivar Fuji. Sendo que somente pela cultura de meristemas não ocorreu a eliminação do vírus.

Dal Conte & Haas (1986), utilizaram esta técnica para eliminar viroses em plantas de videira. Utilizaram os ponteiros e segmentos nodais de cerca de 1 cm de comprimento.

Segundo Martelli (1966), a termoterapia em plantas de macieira, por 4 a 5 semanas à 38°C, elimina o vírus dos ápices, mas não das gemas laterais.

A EMBRAPA/CNPUV, utiliza a termoterapia *in vitro* para a eliminação de viroses em plantas de videira. O material vegetativo utilizado são os ponteiros que após desenvolverem raízes e 3 a 4 folhas vão para a câmara de termoterapia, permanecendo por 2 a 3 semanas. Após este período ocorre a repicagem utilizando os ápices e alguns segmentos nodais (informação pessoal obtida durante o estágio).

A temperatura recomendada para a termoterapia em vaso é de 37-38°C, porém a utilização de 36°C constantes garante maior sobrevivência de plantas, garantindo maior sucesso na eliminação de viroses ( Fridlund, 1989 ). Na Tabela 1, encontram-se as temperaturas e períodos ideais de exposição ao calor para algumas viroses.

**Tabela 1: Lista de algumas viroses da macieira com as respectivas temperaturas e períodos de exposição à termoterapia.**

| Doença              | Agente causal | Temperatura (°C) | Período (dias) |
|---------------------|---------------|------------------|----------------|
| Stem grooving       | ASGV          | 38               | 30             |
| Stem pitting        | ASPV          | 38               | 14-77          |
| Chlorotic leaf spot | CLSV          | 37               | 21             |
| Apple mosaic        | ApMV          | 37               | 14-21          |



## 4.2. CULTURA DE MERISTEMAS

Segundo Torres (1995), a regeneração de plantas a partir da cultura de meristemas foi obtida pela primeira vez em 1942 por Ball. Sendo que maiores êxitos foram obtidos a partir da década de 70 com o trabalho de Smith e Murashige, os quais trabalharam com meristemas de *Nicotiana*, *Daucus*, *Coleus* e *Tropaeolum*.

Ultimamente a cultura de meristemas está sendo muito utilizada para a eliminação de viroses. Segundo Ohkoshi (1991) esta técnica é largamente utilizada para a eliminação de viroses em plantas ornamentais e olerícolas.

Segundo Zimmermam (1989), em 1979 e 1980, Huang conseguiu eliminar o vírus stem grooving de 2 clones de macieira.

Yamaga & Munakata (1991) utilizaram a cultura de meristemas para eliminar o apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) da cultivar Megumi. Testaram diferentes tamanhos da gema apical e verificaram a total eliminação do vírus nos tamanhos compreendidos entre 0,2 e 1 mm.

Zimmermam (1989) utilizou, em suas pesquisas, meristemas de gemas laterais contendo 2 primórdios foliares. Porém confere menor sucesso na eliminação de viroses do que a extração de meristemas apicais.

A cultura de meristemas se baseia no princípio de que o vírus não consiga acompanhar a velocidade de multiplicação e desenvolvimento da região meristemática, tornando-se isenta de vírus. Ainda esta região é avascularizada, o que dificulta ainda mais a disseminação do vírus, tendo que ser feita de célula à célula para chegar até o meristema, sendo por isso um processo muito lento.

No item que trata do experimento de diferentes tamanhos de meristemas, encontra-se a metodologia detalhada da cultura de meristemas para obtenção de plantas isentas de vírus.

## 5. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE VIROSES

Quando se tem uma planta doente, o primeiro passo é o diagnóstico para depois realizar as medidas de controle. Portanto deve-se determinar a natureza e a identidade da doença.

Para muitas doenças a causa pode ser determinada através dos sintomas, porém existem outras doenças, como as viroses, que necessitam de um exame mais detalhado, através de técnicas especiais, para chegar a um diagnóstico correto.

Segundo Sequeira (1992), inicialmente o diagnóstico das viroses era baseado na sintomatologia, ocorrendo muitos erros de identificação, devido à semelhança dos sintomas provocados por diferentes vírus. Com o avanço tecnológico e o crescimento científico, desenvolveram-se testes que diagnosticam com precisão.

Dentre estes testes estão as técnicas sorológicas, mais simples, podendo ser utilizado para bactérias, fungos e vírus. Destacam-se Microprecipitação, Difusão Dupla em Ágar, Aglutinação de Latex e ELISA.(enzyme-linked immunosorbent assay) (Daniels, 1994).

Existem outras técnicas que possibilitam a detecção de viróides, porém exigem laboratórios bem aparelhados e técnicos mais especializados, sendo por isso utilizadas em menor escala. Destacam-se Hibridação Molecular, Microscopia eletrônica de imunoabsorção (IMEA), Imunofluorescência e Rádio imunoensaio.

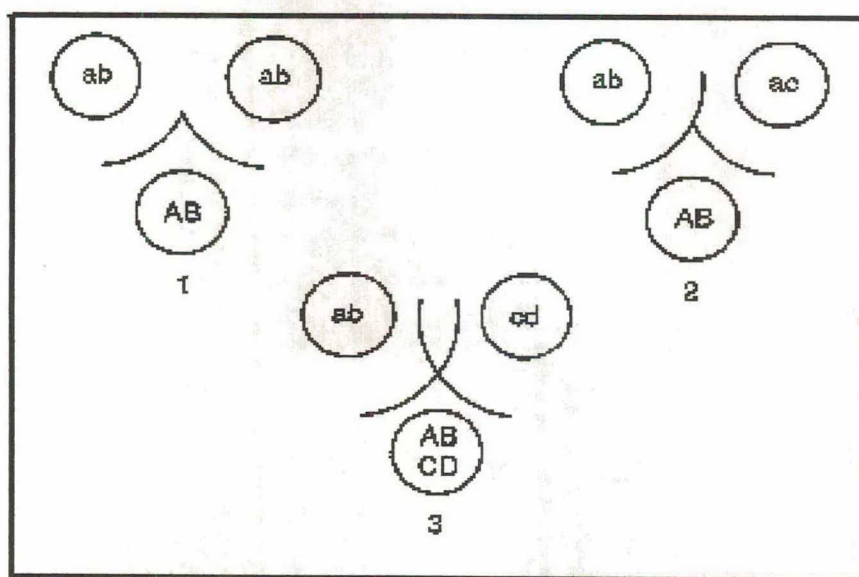
Plantas indicadoras, através da indexagem e inoculação mecânica, também são muito utilizadas para detectar viroses, podendo ser utilizada como técnica complementar das supracitadas. Neste trabalho se ateremos nas técnicas sorológicas e plantas indicadoras, as quais serão descritas nos próximos itens, dando ênfase para os testes ELISA.



## 5.1. DIFUSÃO DUPLA EM AGAR

Segundo Daniels (1994), esta técnica foi desenvolvida por Ouchterlony em 1948 e introduzida na diagnose de viroses por Van Slogteren em 1955. Baseia-se na difusão das suspensões de antígenos<sup>1</sup> e anticorpos<sup>2</sup> pelo agar contido em placas de Petri, as quais quando se encontram formam linhas de precipitação, Figura 2 (Daniels, 1994; Sequeira, 1992).

Este teste é simples, porém pouco sensível, necessitando de antígenos mais concentrados. A vantagem é a possibilidade de determinar interrelações entre antígenos e anticorpos.



Fonte: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1994.

**Figura 2: Representação gráfica do Teste de Difusão Dupla em Agar, sendo os paratopos das imunoglobulinas representados por A, B, C e D, e os epitopos dos antígenos, por a, b, c e d. Tipos de reações: 1- Identidade entre os epitopos; 2- Parcial identidade entre os mesmos e 3- Não identidade.**

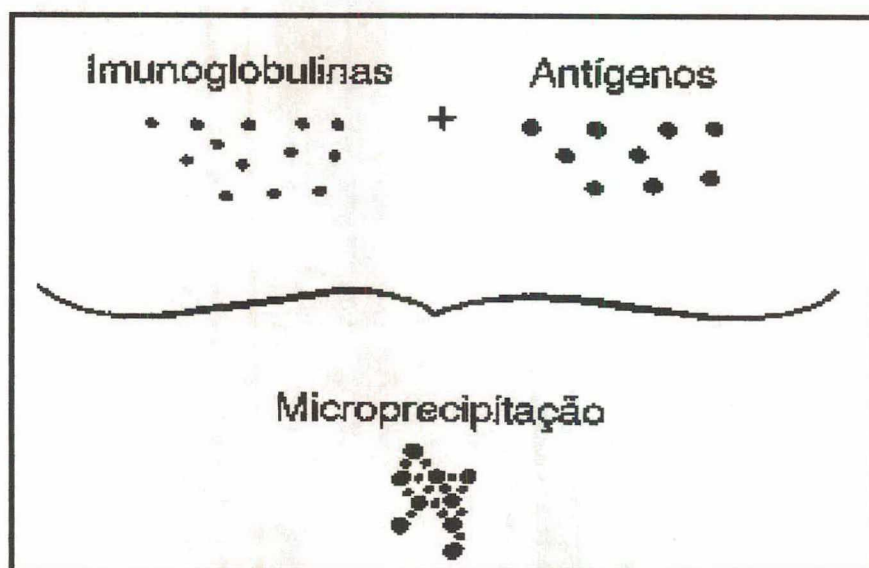
<sup>1</sup> Substância geralmente proteica que se liga especificamente ao anticorpo.

<sup>2</sup> Moléculas de imunoglobulina produzidas pelos linfócitos B, em resposta à um estímulo antigênico. Cada molécula tem 2 ou mais sítios de ligação com antígenos, chamados de **paratopos**.



## 5.2. MICROPRECIPITAÇÃO

Baseia-se na precipitação dos antígenos pela mistura com os anticorpos específicos. Se ocorrer a precipitação é porque ocorreu a reação, ou seja a combinação anticorpo/antígeno, Figura 3. Pode ser feita em placas de Petri plásticas ou de vidro, desde que a superfície seja hidrofóbica. Segundo Martin (1985), citado por Daniels (1994), este teste não detecta vírus quando em baixas concentrações no hospedeiro.



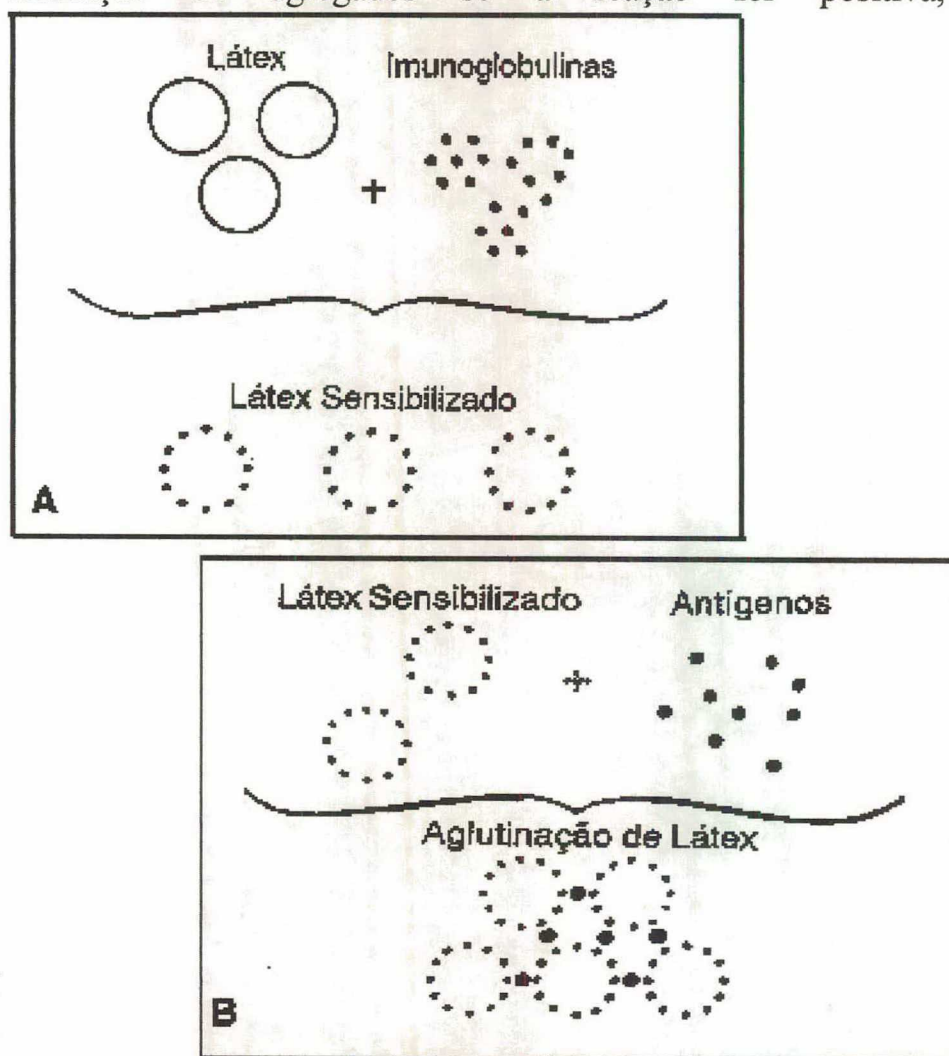
Fonte: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1994.

**Figura 3: Representação gráfica do Teste de Microprecipitação.**

### 5.3. AGLUTINAÇÃO DE LÁTEX

Aglutinação de látex é uma modificação da Microprecipitação, onde utiliza-se de partículas maiores (esferas de látex) para aumentar a sensibilidade do teste (Daniels, 1994).

A maior sensibilidade consiste em misturar as esferas de látex com os anticorpos, os quais ficam aderidos, Figura 4A. Após mistura-se a suspensão de látex sensibilizado com os antígenos específicos. Ocorrerá formação de agregados se a reação for positiva, Figura 4B.



Fonte: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1994.

**Figura 4:** Representação gráfica do Teste de Aglutinação de Látex. A- Sensibilização das esferas de látex com imunoglobulinas; B- Reação serológica do látex sensibilizado com os antígenos homólogos.



## 5.4. ELISA

A técnica de ELISA (enzyme-linked immunossorbent assay) foi descrita por Engwall & Perlmann em 1971, com a finalidade de detectar e quantificar um antígeno (Almeida, s.d.). Este método foi muito utilizado para diagnose de viroses em animais. Sua introdução na fitovirologia deveu-se a Clark & Adams em 1977 (Daniels, 1994; Almeida, s.d.).

O método se baseia no princípio do reconhecimento de um antígeno pelo antisoro (anticorpo). Se ocorrer o reconhecimento, o meio colore-se devido à ação de uma enzima sobre um substrato.

ELISA está sendo muito utilizado ultimamente para detecção de viroses em plantas, devido a sua versatilidade e grande sensibilidade, porém para algumas viroses da macieira não se mostra eficiente, principalmente por aquelas provocadas por micoplasmas e riquetsias. Na Tabela 2, encontram-se as principais viroses que o método ELISA detecta com eficiência.

Existem diversas variações do método que utilizam diferentes suportes sólidos, dependendo do princípio em que macromoléculas se aderem à plástico, borracha, vidro e silicone através da reação hidrofóbica não covalente provocando adsorção (Almeida, s.d.). O suporte mais utilizado é a placa de plástico para microtitulação (Figura 5) que permite realizar testes de várias amostras.

Para maior facilidade de execução do teste, utiliza-se Kits importados, nos quais encontram-se: Tampões, anticorpo, conjugado, substrato, placas sólidas, controle positivo-negativo. Estes podem ser observados na Figura 6, juntamente com os demais materiais necessários para realizar o teste.

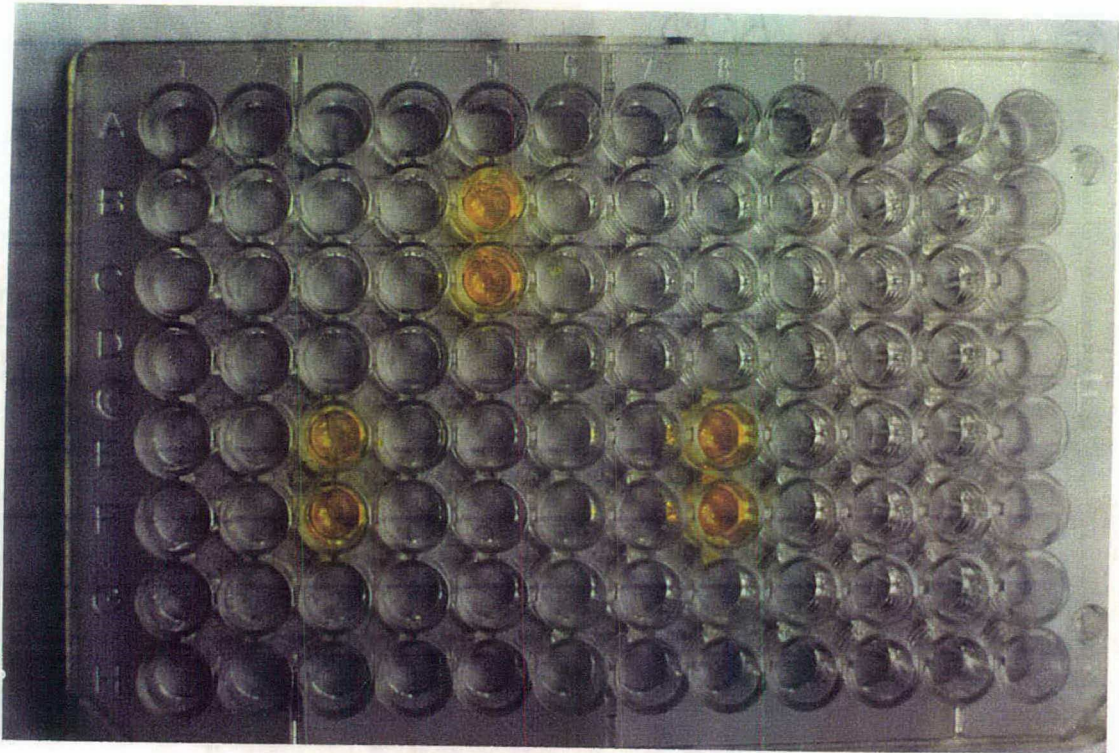
As técnicas ELISA dividem-se em testes diretos e indiretos. No teste direto, o anticorpo é utilizado na detecção e na conjugação com a enzima, sendo específico ao antígeno. Já no indireto, o conjugado não é específico ao antígeno a ser detectado. No teste direto destaca-se o teste DAS e no indireto destacam-se PAS e TAS, os quais veremos a seguir.



**Tabela 2: Relação de viroses da macieira que são detectadas com eficiência pelo método ELISA.**

| Doença                    | Agente causal                |
|---------------------------|------------------------------|
| Apple chlorotic leaf spot | CLSV                         |
| Apple stem grooving       | SGV                          |
| Apple mosaic virus        | ApMV                         |
| Apple flat apple          | Cherry rasp leaf virus (RLV) |
| Apple union necrosis      | Tomato ring spot (TomRSV)    |

Fonte: Acta Horticulturae 309, 1992.



**Figura 5: Placa plástica de microtitulação utilizada como suporte sólido no Teste ELISA.**



Figura 6: Material utilizado para a realização do Teste ELIZA.

#### 5.4.1. DAS ( DOUBLE ANTIBODY SANDWICH)

Este é um método direto, original popularizado por Clark e Adams (1977). Neste método utiliza-se a placa plástica de microtitulação, envolvendo 4 etapas, Figura 7 :

- 1- Anticorpos adsorvidos;
- 2- Aderência do antígeno (amostra) aos anticorpos;
- 3- Conjugado específico, na presença do antígeno formará o sanduíche;
- 4- Substrato da enzima conjugada para realizar a reação calorimétrica.

A desvantagem deste teste é alta especificidade, ocorrendo a não detecção de estirpes do mesmo vírus por determinada imunoglobulina (Sequeira, 1992).

A metodologia deste teste estará descrita em Anexo 1.



#### 5.4.2. PAS ( PROTEIN A SANDWICH )

Método indireto, utilizado pela primeira vez em 1985 por Edwards & Cooper. Utiliza a proteína A, extraída de *Streptococcus aureus*, para se ligar a parte cristalizável da imunoglobulina de várias espécies de animais (Harlow & Lane, 1988), citados por (Daniels, 1994). É utilizada como agente ligante entre o marcador e o anticorpo sem ocorrer contato direto entre ambos (Sequeira, 1992).

O método é composto por 6 etapas, Figura 7:

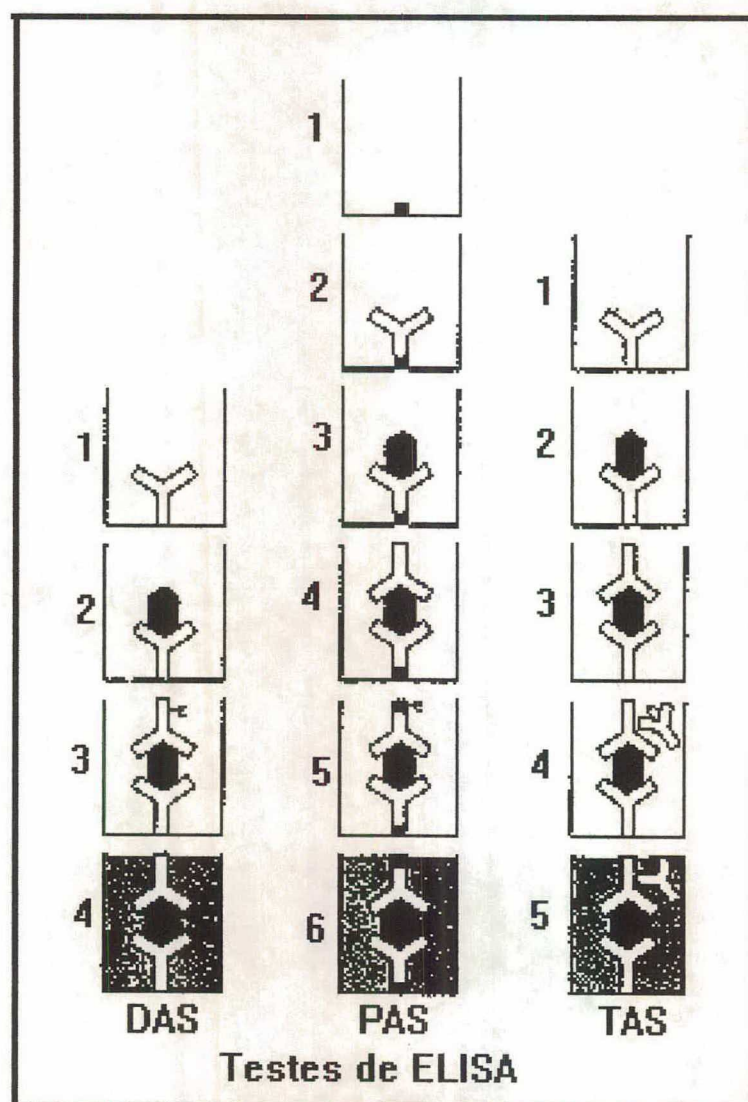
- 1- Introdução da proteína A;
- 2- Introdução do anti-soro bruto;
- 3- Adição de antígeno (amostras);
- 4- Reaplicação do anti-soro;
- 5- Adição do conjugado de enzima com proteína A;
- 6- Adição do substrato da enzima.

A vantagem deste método é a utilização de um mesmo tipo de conjugado e anti-soro bruto.

#### 5.4.3. TAS ( TRIPLE ANTIBODY SANDWICH)

Este também é um método indireto, utiliza a placa plástica de microtitulação, segundo Ellis & Wiezorek (1992), citados por Daniels (1994), envolve 5 etapas, Figura 7:

- 1- Introdução dos anticorpos policlonais produzidos em coelhos;
- 2- Adição do antígeno (amostras);
- 3- Adição do segundo anticorpo, monoclonal, produzido em ratos;
- 4- Adição do conjugado de enzima com o terceiro anticorpo, para reagir com a imunoglobulina de rato;
- 5- Finalmente, adição do substrato da enzima.



Y Imunoglobulina    ■\* Conjugado (Prot. A/enz)  
 ■ Proteína A    ■ Antígeno  
 Y\* Conjugado (IgG/enz)

Fonte: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1994.

**Figura 7: Representação gráfica de testes Elisa: DAS (double antibody sandwich); PAS (protein A sandwich); TAS (triple antibody sandwich).**



## **5.5. PLANTAS INDICADORAS**

Com o advento da tecnologia os testes sorológicos estão sendo muito utilizados, porém para algumas viroses estes não se mostram eficientes. Ainda pode ocorrer falso positivo quando se utilizam brotos de rápido crescimento como amostras (Ramsdell, 1989). Para auxiliá-los, utilizam-se plantas indicadoras, ou seja, aquelas mais sensíveis que apresentam os sintomas característicos de determinada virose.

As plantas indicadoras podem ser lenhosas ou herbáceas.

Nas lenhosas o que se procede é a indexagem, ou seja, é a enxertia de borbulha ou de ramo da amostra que se deseja fazer o teste de detecção em mudas de plantas sensíveis à determinados vírus. Estas plantas podem ficar a campo ou em casa de vegetação, onde ocorre melhores resultados devido ao controle do ambiente. Os resultados serão obtidos após um longo período que pode durar meses e até anos quando a indexagem é realizada a campo.

Em plantas herbáceas procede-se a inoculação mecânica do vírus, obtido através do líquido extraído (antígeno) da amostra infectada, nas folhas da planta indicadora. A inoculação deve ser feita em plantas novas (2-3 folhas), podendo utilizar folhas e cotilédones para a inoculação, Figura 8. Para obter maior sucesso deve-se inocular imediatamente após a extração do antígeno (Fernandez Valiela, 1969). Os resultados são menos demorados que os de plantas lenhosas, levam cerca 20 dias para demonstrar os sintomas característicos.

A metodologia da inoculação de vírus em plantas indicadoras herbáceas será descrita em Anexo 2.

Na Tabela 3 encontram-se as plantas indicadoras das principais viroses da macieira.



**Tabela 3: Viroses da macieira detectadas por plantas indicadoras herbáceas, lenhosas em casa de vegetação e à campo, com os respectivos número de repetições necessárias para o sucesso do teste, temperatura ideal para o desenvolvimento dos sintomas e período necessário para o aparecimento dos sintomas.**

| Planta indicadora                    | Viroses detectadas          | Repetições | Temperatura (°C) | Período do teste |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------|------------------|------------------|
| <b>Hebáceas</b>                      |                             |            |                  |                  |
| <i>Chenopodium quinoa</i>            | CLSV, SGV, ApMV e nepovirus | 5          | 20               | 20 d             |
| <i>Cucumis sativus</i>               | ApMV                        | 3          | 20               | 20 d             |
| <b>Lenhosas, casa de vegetação</b>   |                             |            |                  |                  |
| <i>Malus platycarpa</i>              | CLSV e Scaly bark           | 3          | 20               | 8 s              |
|                                      |                             | 3          |                  | 8 s              |
| <i>Malus pumila</i><br>Virginia Crab | Stem pitting e SGV          | 3          | 26               | 24 s             |
| R 12740 7A                           | CLSV                        | 3          | 22               | 4 s              |
| Spy 227                              | Stem pitting                | 3          | 22-25            | 12 s             |
| Kola, Radiant                        | Stem pitting                | 3          | 26               | 8 s              |
| <i>Cydonia oblonga</i>               | CLSV                        | 4          | 22               | 5 s              |
| <b>a campo</b>                       |                             |            |                  |                  |
| <i>Malus platycarpa</i>              | CLSV, Scaly bark            | 3          |                  | 2 a              |
|                                      |                             | 3          |                  | 2 a              |
| <i>Pyronia veitchii</i>              | Stem pitting                | 3          |                  | 2 a              |
| <i>Malus pumila</i><br>Virginia Crab | Stem pitting e SGV          | 3          |                  | 3 a              |
|                                      |                             | 3          |                  | 3 a              |
| Spy 227                              | Stem pitting                | 3          |                  | 2 a              |
| R 12740 7A                           | CLSV                        | 3          |                  | 2 a              |
|                                      | Rubbery wood                |            |                  | 3 a              |
| Lord Lambourne                       | Flat limb e Chat            | 5          |                  | 3 a              |
|                                      | fruit                       |            |                  | 3 a              |
| Gravensteiner                        | Flat limb                   | 3          |                  | 3 a              |
|                                      | ApMV,                       | 3          |                  | 2 a              |
|                                      | Proliferation, Star         | 5          |                  | 2 a              |
|                                      | crack, Rough skin,          | 3          |                  | 3 a              |
| Golden Delicious                     | Ring spot, Green            | 3          |                  | 3 a              |
|                                      | crinkle, Flat apple e       | 3          |                  | 3 a              |
|                                      | RLV                         | 3          |                  | 3 a              |
|                                      |                             | 3          |                  | 3 a              |

Fonte: Acta Horticulture 309, 1992.

(d)- dia      (s)- semana      (a)- ano





Figura 8: Inoculação mecânica de vírus em plantas novas de pepino (*Cucumis sativus*).

## 6. PERSPECTIVAS DE EXPERIMENTOS

Inicialmente a idéia era testar a eficiência de 3 métodos de eliminação de vírus, os quais seriam a extração de meristemas, cultura de ponteiros com termoterapia *in vitro* e termoterapia em vaso com posterior isolamento de ponteiros *in vitro*. Porém devido à problemas ocorridos na falta de material vegetativo infectado com o vírus do mosaico, principalmente ponteiros herbáceos e mudas para a termoterapia em vaso, modificou-se um pouco esta idéia partindo-se para as seguintes perspectivas de experimentos:

- Extração de meristemas com 4 diferentes tamanhos de explantes meristemáticos (0,5-1mm), (1-2mm), (2-3mm) e (3-4mm), sendo que os de 2 à 4mm podem ser considerados como ponteiros, pois nestes tamanhos encontram-se vários primórdios foliares, folhas protetoras e tecido adjacente ao meristema, pertencente à gema apical.

→ A hipótese é que somente o domo apical juntamente com 1 ou 2 primórdios foliares (0,2-0,5mm) esteja isento de vírus. Serão realizados testes de detecção de viroses para comparar a eficiência de limpeza, se for detectado que em maiores tamanhos de explantes meristemáticos também ocorre a eliminação de vírus, não será mais necessário extrair meristemas, os quais são mais difíceis de serem extraídos.

- Termoterapia *in vitro*, utilizando os 4 tamanhos de explantes meristemáticos supra citados.

→ Neste caso a termoterapia aumentaria a eficiência na eliminação do vírus. Seria comparada a eficiência de eliminação entre os 4 tamanhos já citados e em relação à extração de meristemas para verificar qual é mais eficiente e mais confiável.



- Extração de ponteiros e segmentos nodais provenientes de mudas de macieira que foram submetidas à termoterapia em vaso.

→ Espera-se que somente o ponteiro esteja isento de vírus. Com isto poderá ser verificada a ausência ou não de vírus em segmentos à baixo do ponteiro. Pode-se também comparar a eficiência de eliminação de vírus com os dois métodos supra citados.

Para realizar estes experimentos são necessárias 3 etapas: Introdução do material vegetativo *in vitro* (Isolamento), micropropagação do material regenerado *in vitro* (multiplicação e enraizamento) e testes de detecção de viroses (ELISA). Estas poderão ser melhor entendidas visualizando a esquema ilustrativo contido na Figura 11.

A primeira etapa já se realizou durante o período do estágio, a segunda poderá ser realizada a medida que os explantes forem entrando em condições ideais de desenvolvimento e crescimento para a multiplicação. Na terceira etapa que será verificada e comparada a eficiência dos métodos, sendo que somente aí serão utilizados modelos estatísticos.

Para se chegar à resultados será necessário um período médio de tempo o qual gira em torno de 1 ano, sendo por isso impossível apresentar os resultados de eficiência. Porém o acompanhamento continuará até obter estes resultados os quais poderão ser publicados em congressos e revistas de fruticultura.

## **7. EXTRAÇÃO DE MERISTEMAS DE DIFERENTES TAMANHOS PARA ELIMINAÇÃO DO VÍRUS DO MOSAICO DA MACIEIRA**

O objetivo de se realizar a extração de meristemas fundamentou-se na questão de que o meristema é a única porção da planta isenta de vírus, devido à avascularização e à rapidez da multiplicação das células desta região. Porém esta porção, composta pelo domo apical mais 1 ou 2 primórdios foliares é muito diminuta, cerca de 0,2 a 1 mm, dificultando sua extração. Então para diminuir a dificuldade da extração de meristemas, realizou-se o isolamento de meristemas de diferentes tamanhos, os quais seriam compostos pelo domo apical, por vários primórdios e parte de tecido adjacente ao meristema apical.

A hipótese a ser testada após a obtenção das plântulas, através do teste ELISA, é que tamanhos maiores de meristemas, mais fáceis de serem extraídos, também podem ser eficientes na eliminação do ApMV.

### **7.1. MATERIAL E MÉTODOS**

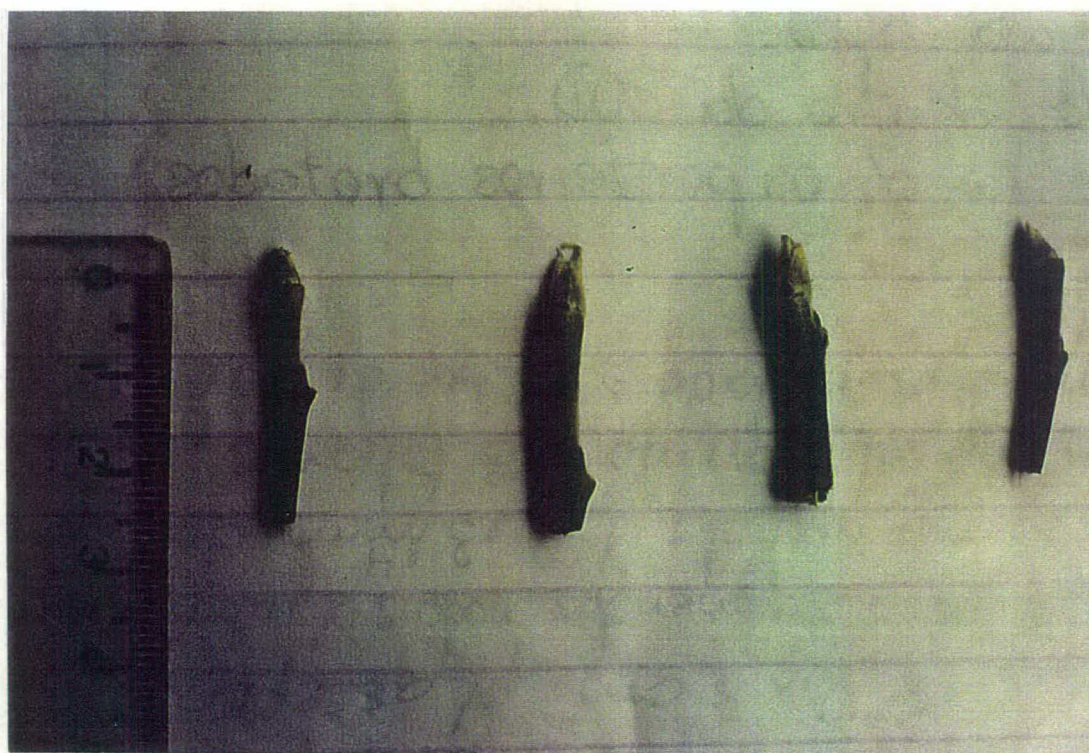
Ramos de macieira infectados com o ApMV, Figura 9, foram coletados no dia 26 de Janeiro de 1996 na Estação experimental da EMBRAPA em Vacaria. Coletou-se ramos de 2 plantas da cultivar Golden Delicious, numeradas como 12 e 21, e de 1 planta da cultivar Gala, numerada como 28. Os ramos foram acondicionados em sacos plásticos e conservados em geladeira até o momento da assepsia e isolamento

Para a assepsia do material vegetativo, utilizou-se segmentos apicais de 3 cm de comprimento em média, Figura 10. Primeiramente os segmentos foram mergulhados em uma solução de água destilada contendo





**Figura 9: Ramo de 'Gala' infectado com o ApMV, coletado em Vacaria.**



**Figura 10: Segmentos dos ramos infectados, utilizados na assepsia e extração.**



detergente, permanecendo em agitação por 20 minutos. Após este período realizou-se 4 enxágues com água destilada para retirar o excesso de detergente. Em Câmara de Fluxo Laminar, mergulhou-se os explantes por 3 minutos em uma solução de Álcool 70 %. Posteriormente transferiu-se os explantes para uma solução de Hipoclorito de sódio 2 %, permanecendo 20 minutos sob agitação constante. Terminado este período, realizou-se 3 enxágues com água destilada e esterilizada.

Após assepsia os explantes permaneceram, até o momento da extração, em uma solução de água destilada contendo Sulfito de Sódio (10 g/l), para evitar a oxidação dos tecidos.

Ainda em Câmara de Fluxo Laminar, com auxílio de um Estéreomicroscópio, realizou-se a extração dos diferentes tamanhos de meristemas apicais (Fase de isolamento). Para se chegar ao meristema, com o auxílio de uma pinça e um bisturi, escalpelou-se folha protetora por folha protetora, até chegar nos tamanhos de meristemas escolhidos. Tomando cuidado para não cortá-las, o que aumentaria a oxidação dos explantes. Para evitar a oxidação dos explantes, a extração foi realizada em placa de petri contendo uma solução anti-oxidante, composta por Nicotina (1 ml/l água).

Os tamanhos de meristemas extraídos foram: 0,5 a 1 mm; 1 a 2 mm; 2 a 3 mm e 3 a 4 mm, tamanho obtido segundo a escala contida no Estéreomicroscópio.

Após extração, os meristemas foram introduzidos em tubos de ensaio contendo 5 ml do meio de cultura M.S (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 5 ml/l de vitaminas M.S, 30 g/l de Sacarose, 6 g/l de ágar, 0,1 mg/l de BAP (6-Benzil amino purina) e 0,01 mg/l de ANA (Ácido naftaleno acético).

Após a introdução, os explantes permaneceram no escuro por 5 dias, sendo posteriormente transferidos para a Câmara de crescimento, aonde permaneceram 30 dias. Passado este período de isolamento, os explantes foram transferidos para tubos de ensaio contendo 20 ml do meio de cultura M.S acrescido de 5 ml/l de vitaminas M.S, 30 g/l de Sacarose, 6 g/l de ágar e

0,25 mg/l de BAP, aonde permaneceram até a formação de eixos caulinares, ou seja, até a regeneração da plântula. Após sua formação, foram transferidos para meios de multiplicação semelhantes ao supracitado modificando apenas a concentração de BAP (0,5 mg/l). Para este experimento serão realizadas 5 repicagens (subculturas) com intervalo de 30 dias, para posteriormente serem aplicados os testes de detecção do ApMV.

A detecção será realizada através do teste ELISA seguindo o modelo utilizado por Yamaga & Munakata (1991) que na ocasião utilizaram para a detecção de CLSV (Chlorotic leaf spot virus). Neste modelo mudaremos somente o anticorpo utilizado, o qual será para o ApMV.

A metodologia pode ser melhor entendida através do desenho esquemático contido na Figura 11.



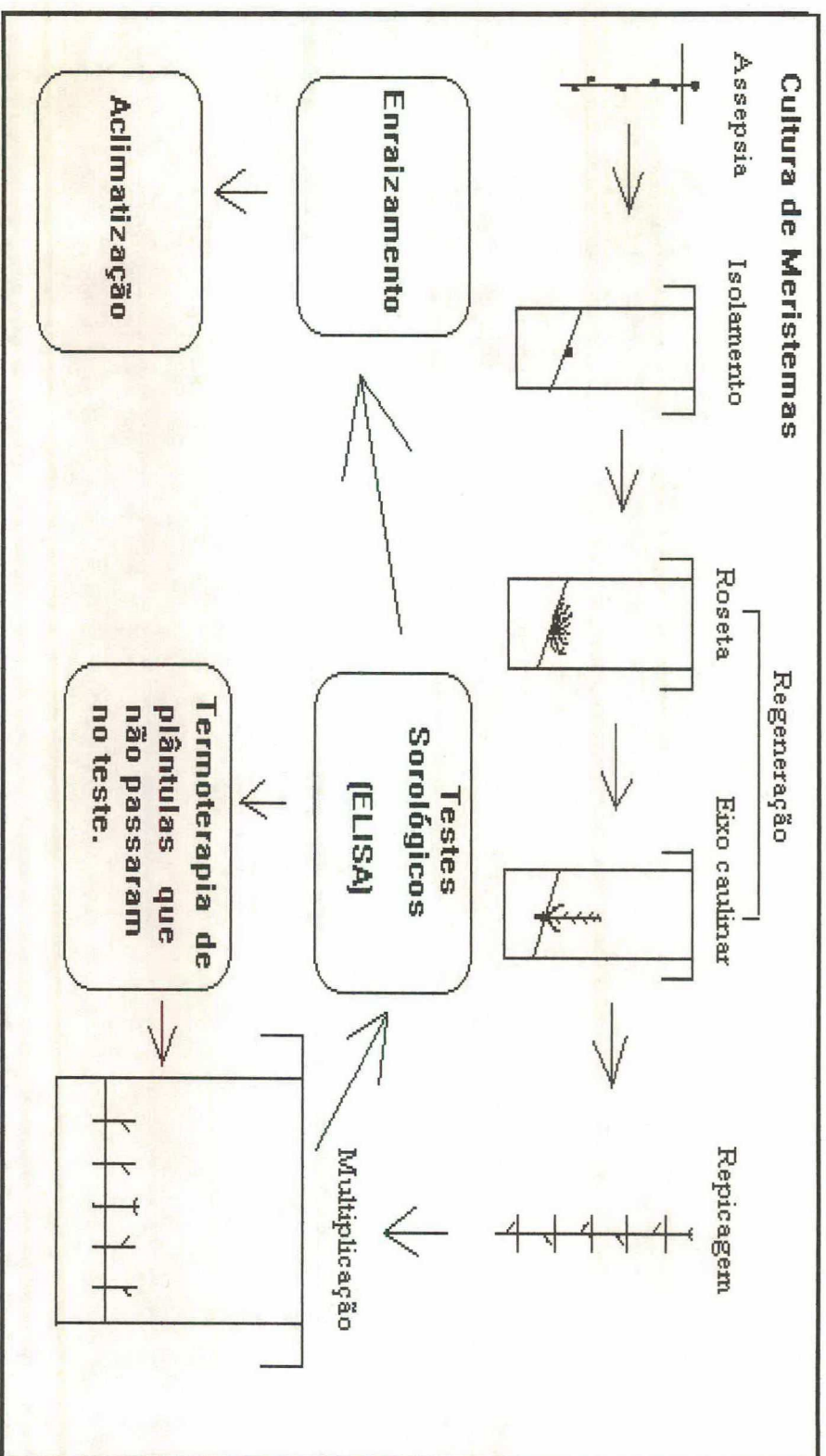


Figura 11: Desenho esquemático das etapas que envolvem a metodologia da Cultura de Meristemas para a eliminação de vírus

## 7.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o presente momento, não foram obtidos resultados finais no que diz respeito à eliminação do vírus, pois os explantes encontram-se em estágio de início de multiplicação, sendo que serão necessárias 4 a 5 subculturas, não sendo possível procederem os testes de detecção. No presente momento pode-se avaliar os resultados das fases preliminares (asepsia e isolamento).

**Tabela 4: Número de meristemas extraídos, isolados e contaminados das cultivares Gala 28, Golden 21 e 12 com seus respectivos tamanhos de meristemas.**

| Cultivar  | Tamanho (mm) | Extraídos | Isolados | Contaminação |
|-----------|--------------|-----------|----------|--------------|
| Gala 28   | 0,5-1        | 37        | 28       | 9            |
| Golden 21 | 1-2          | 38        | 13       | 25           |
| Gala 28   | 2-3          | 40        | 29       | 11           |
| Golden 12 | 3-4          | 39        | 12       | 27           |

Após o período de 30 dias ao proceder a renovação do meio de cultura, retirou-se todos os meristemas contaminados. Através da Figura 12 poderão ser visualizadas as contaminações dos meristemas. Com o auxílio dos dados obtidos (Tabela 4), melhor ilustrados pelo gráfico da Figura 13, verificou-se a ocorrência de altas taxas de contaminação dos meristemas extraídos dos ramos das plantas 21 (1-2 mm) e 12 (3-4 mm) de 'Golden Delicious', 65,8 % e 69,2 % respectivamente. Para os tamanhos de meristemas extraídos de ramos da planta de 'Gala' 28 (0,5-1 e 2-3 mm), foram obtidas baixas taxas de contaminação, 24,3 e 27,5 % respectivamente, possibilitando maior sucesso na obtenção de eixos caulinares.



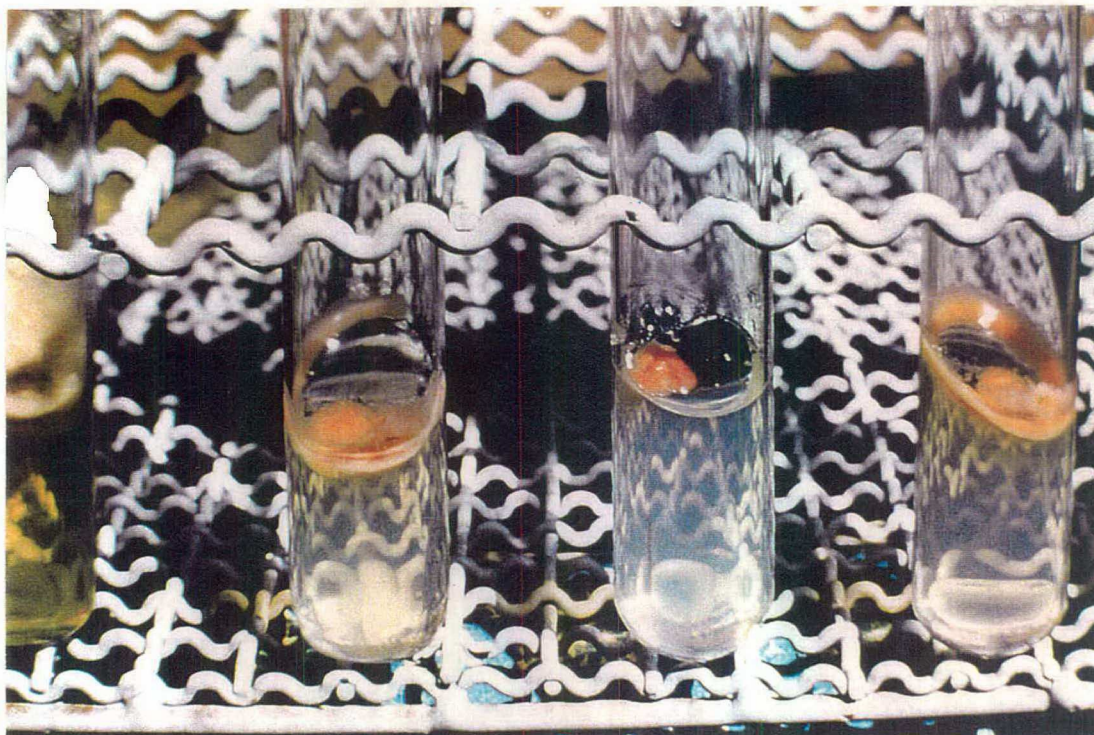


Figura 12: Detalhe das contaminações ocorridas com maior frequência no isolamento de meristemas.

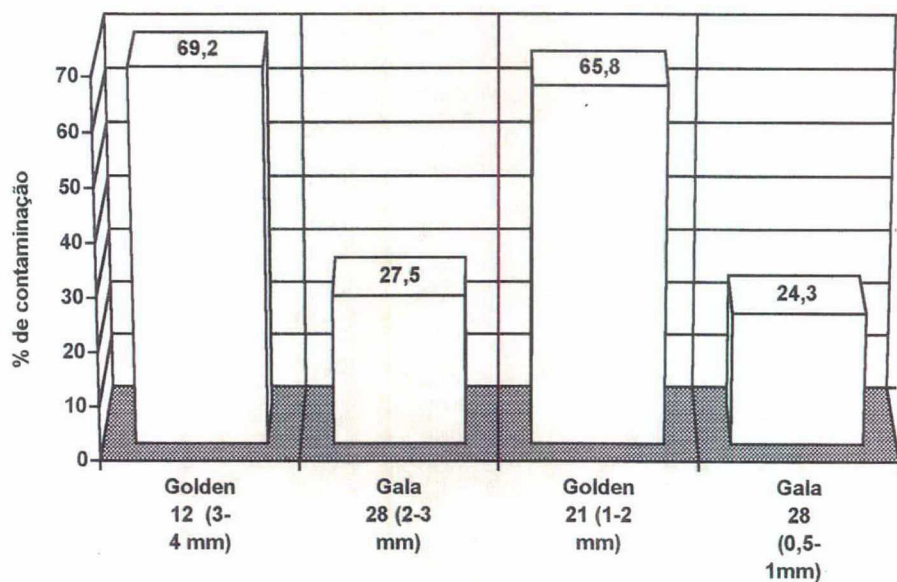


Figura 13: Taxa de contaminação dos diferentes tamanhos de meristemas extraídos dos ramos das cultivares Gala e Golden Delicious.



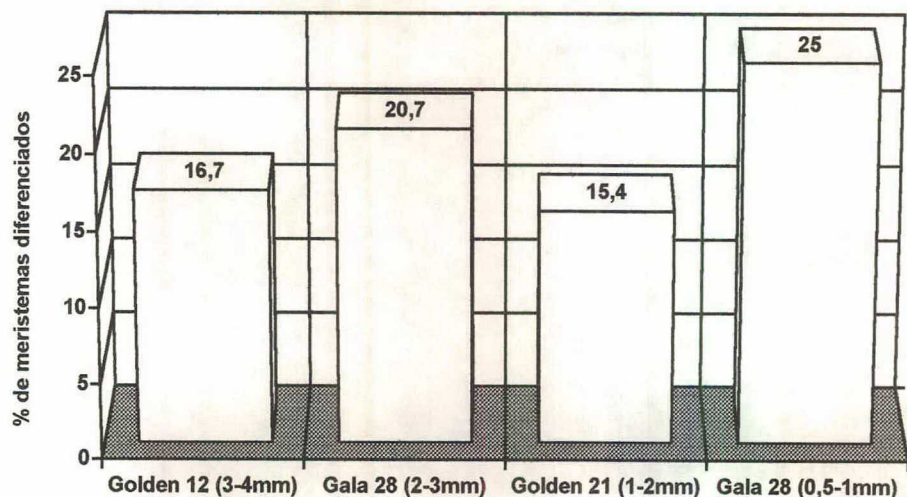
As altas taxas de contaminação dos meristemas extraídos das plantas de 'Golden Delicious' mostram que para esta cultivar, quando a campo, se faz necessária uma assepsia mais forte e eficaz, caso contrário, será muito difícil obter meristemas isentos de contaminação para posterior multiplicação de material isento de vírus.

Ainda, mais importante que a contaminação é a diferenciação dos meristemas isolados em eixos caulinares, os quais posteriormente serão multiplicados 4 a 5 vezes antes de ocorrerem os testes. Conforme dados da Tabela 5, ilustrados pelo gráfico da Figura 14, verificou-se que poucos meristemas se diferenciaram em roseta foliar, Figura 15, primeiramente, e eixo caulinar, posteriormente. Os meristemas da 'Gala' 28, nos tamanhos de 0,5-1 e 2-3 mm foram os que diferenciaram em maior quantidade, 7 e 6 respectivamente. Já para os meristemas de 'Golden' 12 (3-4 mm) e 21 (1-2mm) apenas 2 para cada uma se diferenciaram, sendo que em ambos ocorreu forte <sup>3</sup> vitrificação, sendo praticamente irreversível. Para reverter este processo, transferiu-se os explantes para tubos contendo o meio M.S sem regulador de crescimento.

**Tabela 5: Número de meristemas isolados que se diferenciaram em roseta foliar e eixo caulinar, para as cultivares Gala 28, Golden 12 e 21.**

| Cultivar  | Tamanho (mm) | Isolados | Diferenciados |
|-----------|--------------|----------|---------------|
| Gala 28   | 0,5-1        | 28       | 7             |
| Golden 21 | 1-2          | 13       | 2             |
| Gala 28   | 2-3          | 29       | 6             |
| Golden 12 | 3-4          | 12       | 2             |

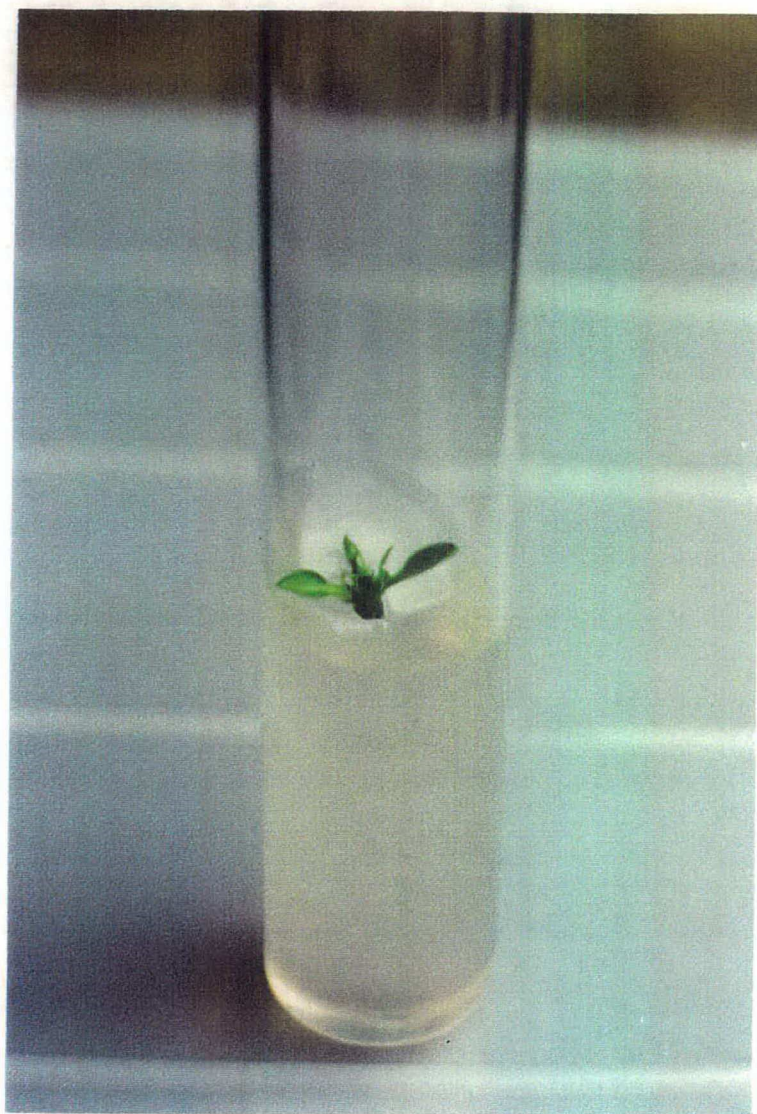
<sup>3</sup> Distúrbio fisiológico ocorrido devido ao excesso de nitrogênio e regulador de crescimento no meio de cultura, causando nas folhas aspecto vítreo brilhante, acarretando o endurecimento e quebra das folhas.



**Figura 14: Porcentagem dos diferentes tamanhos de meristemas extraídos que se diferenciaram em roseta e eixo caulinar.**

A baixa taxa de diferenciação pode ser explicada pela época em que se realizou a coleta do material. Esta se realizou no fim de Janeiro, sendo que existiam, nas plantas infectadas, poucos ramos do ano, tendo que ser retirado, também, ramos de ano (+ de 1 ano). Nestes ramos, a maioria dos meristemas apicais estavam diferenciados em gemas reprodutivas e não em gemas vegetativas, sendo assim muito difícil ocorrer a rediferenciação. Isto pôde ser verificado através dos segmentos de ramos que foram induzidos à brotação e enraizamento em câmara de nebulização, Figura 16.





**Figura 15:** Início da regeneração da planta, ocorrendo primeiro a diferenciação em roseta foliar.



Figura 16: Segmentos dos ramos coletados que foram induzidos ao enraizamento e brotação, sendo que em muitas gemas ocorreu a produção de flores.

## 8. ISOLAMENTO *IN VITRO* DE PONTEIROS E SEGMENTOS NODAIS

Este experimento visa principalmente a eliminação do ApMV através da cultura de ponteiros, extraídos de mudas de macieira provenientes de termoterapia. A idéia de se extrair ponteiros e segmentos nodais baseia-se no princípio da maior facilidade de extração, não sendo necessária a utilização de Estéreomicroscópio e instrumentos mais delicados.

As mudas utilizadas foram submetidas à termoterapia para que fosse possível um crescimento vegetativo maior que a multiplicação do vírus. Pois como foi visto, o vírus em ambiente desfavorável (temperatura e umidade



altas) diminui sua taxa de multiplicação, em contra partida, neste ambiente a planta aumenta seu crescimento, possibilitando a retirada de ponteiros e até segmentos isentos de vírus.

Para obter maior quantidade de material vegetativo isento de vírus utiliza-se a cultura de tecidos através do isolamento e micropropagação destes ponteiros e segmentos nodais. Este material isolado pode ser submetido novamente à termoterapia, só que agora *in vitro*, possibilitando maior eficiência na eliminação do vírus.

A eficiência da eliminação do vírus será testada através do teste ELISA.

## **8.1. MATERIAL E MÉTODOS**

Duas mudas de macieira da cultivar Gala infectadas com ApMV foram submetidas à termoterapia em Câmara BOD, (Figura 17) . Inicialmente a temperatura foi ajustada para 35°C durante 5 dias, para evitar estresse da planta. Posteriormente a temperatura foi ajustada para 37°C durante 20 dias. Durante este período realizou-se o acompanhamento do crescimento das brotações, o qual depois poderá ser relacionado com a maior ou menor eficiência da eliminação do vírus.





**Figura 17: Detalhe das mudas de 'Gala' infectadas com ApMV em Câmara de Termoterapia.**

Passado o período de termoterapia, retirou-se as plantas da Câmara e realizou-se a última avaliação do crescimento da brotação. Posteriormente extraiu-se um segmento da brotação de cada planta: Da planta 1 (p1) foi retirado um segmento de 8,2 cm e da planta 2 (p2) um segmento de 2,1 cm de comprimento.

Estes posteriormente foram submetidos à assepsia. Primeiramente foram mergulhados em uma solução contendo água destilada, detergente e antioxidante, permanecendo durante 10 minutos sob agitação. Após este período, realizou-se 4 enxágues com água destilada. Em Câmara de Fluxo

Laminar, transferiu-se para uma solução de Álcool 70% por 1 minuto, sendo posteriormente transferidos para uma solução de Hipoclorito de Sódio 2 %, aonde permaneceram 10 minutos sob agitação constante. Feito isto, os segmentos foram enxaguados 4 vezes com água destilada/esterilizada, sendo então transferidos para uma solução contendo água destilada/esterilizada e Sulfito de Sódio (10 g/l), permanecendo até o momento da introdução *in vitro*.

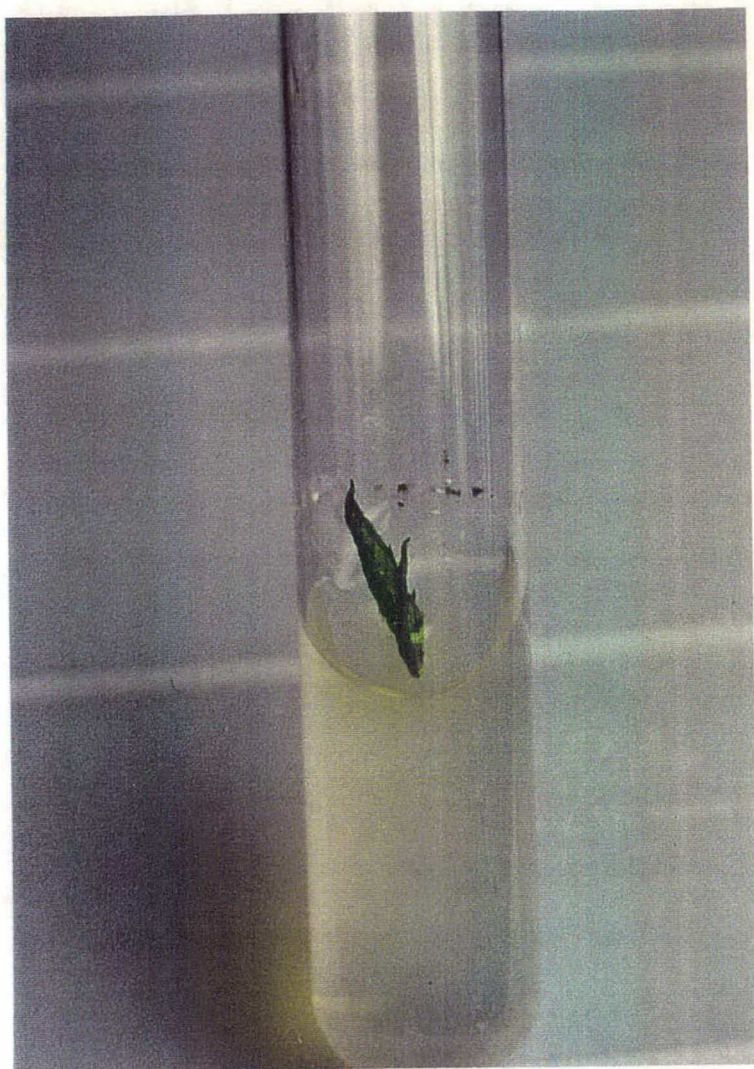
Ainda em Câmara de Fluxo Laminar, em placas de Petri contendo sulfito de sódio, retirou-se as folhas e septou-se os segmentos nodais e ponteiro, numerando-os conforme a sequência de cada um no sentido ápice/base, com isso se obtivermos sucesso no isolamento espera-se verificar até em qual segmento foi possível a eliminação. Após preparação dos explantes, separadamente cada segmento e ponteiro foi introduzido em tubos de ensaio contendo 20 ml do meio de cultura M.S acrescido de 5 ml/l de vitaminas M.S, 30 g/l de Sacarose, 6 g/l de ágar e 0,25 mg/l de BAP (Figura 18).

A metodologia pode ser melhor entendida com a visualização da Figura 19.

Após introdução, os segmentos foram levados para Câmara de Crescimento, permanecendo 3 dias no escuro.

Após obtenção de brotação, serão realizadas 5 repicagens, com intervalo de 30 dias entre cada uma, para posteriormente realizar os testes de detecção de virose, através do teste ELISA. Podendo então detectar se houve eliminação ou não do ApMV.





**Figura 18:** Isolamento *in vitro* do ponteiro extraído da muda de 'Gala', proveniente da termoterapia.

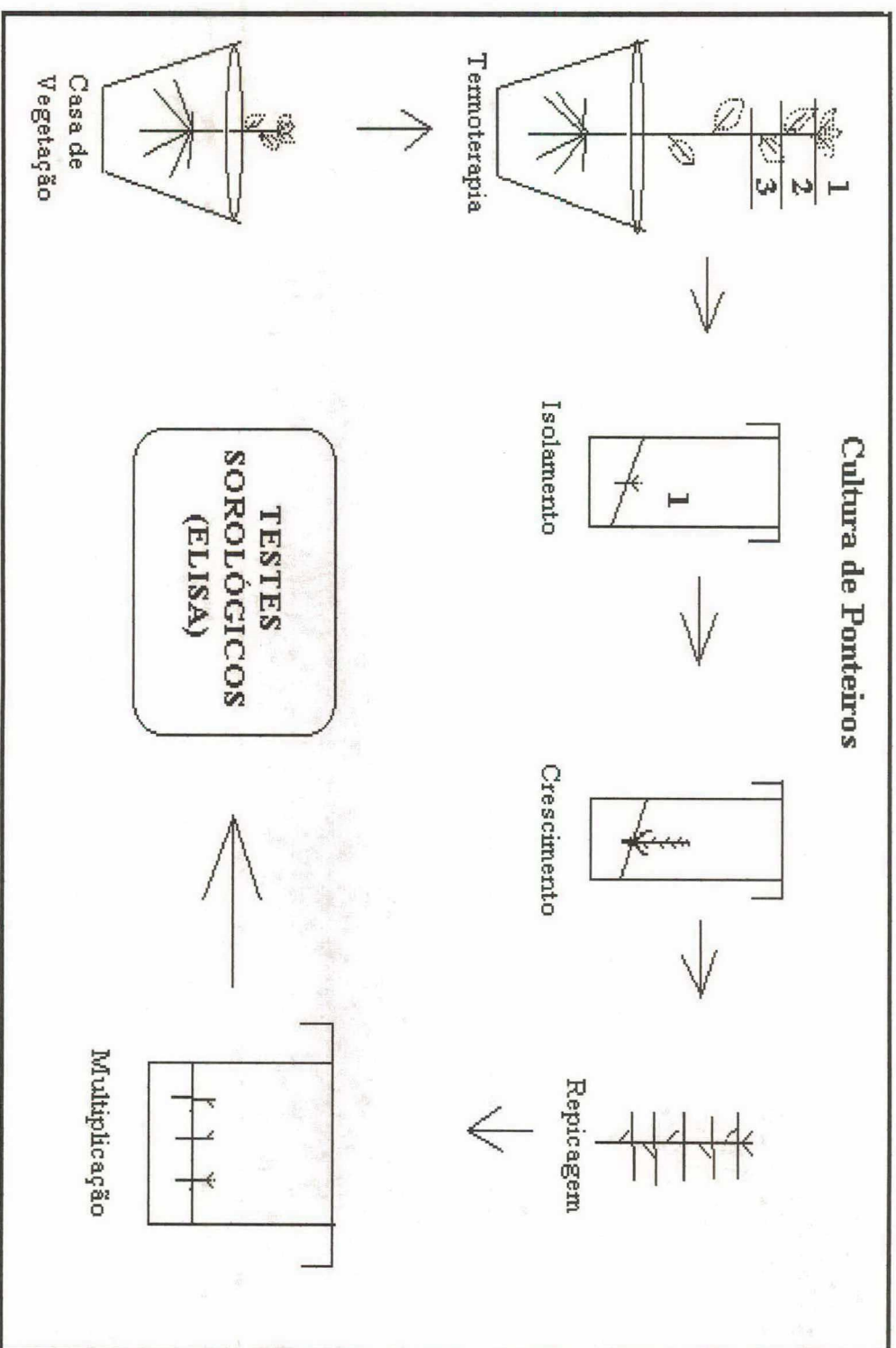


Figura 19: Desenho esquemático das etapas que envolvem a metodologia da Cultura de Ponteiros provenientes da Termoterapia.

## 8.2. RESULTADOS

Novamente não foi possível a obtenção de resultados finais devido à alguns problemas como forte oxidação<sup>4</sup>, (Figura 20), contaminação e curto espaço de tempo oferecido para o estágio em relação ao período exigido para a obtenção de plântulas *in vitro*.

**Tabela 6: Crescimento das brotações das plantas de 'Gala', infectadas com o ApMV, submetidas à termoterapia, durante 25 dias.**

| Planta | Crescimento da brotação (cm) |         |         | Total de crescimento (cm) |
|--------|------------------------------|---------|---------|---------------------------|
|        | 0 dias                       | 10 dias | 25 dias |                           |
| 1      | 7,5                          | 10,5    | 21,5    | 14                        |
| 2      | 12,6                         | 15,0    | 17,0    | 4,4                       |

Como pode ser visto através dos dados contidos na Tabela 6, as plantas apresentaram um bom crescimento, principalmente a planta 1 que produziu um broto de 14 cm em 25 dias de termoterapia. Isto é muito importante pois quanto maior for o crescimento do broto maiores serão as chances do ponteiro e de alguns segmentos nodais estarem isentos de vírus.

A planta 1, produziu um broto de 8,2 cm e a planta 2, produziu um broto de 2,1 cm de comprimento.

Como pode ser visto na Tabela 7, após 1 mês de cultura *in vitro*, restaram somente 2 segmentos de cada planta. Isto ocorreu principalmente devido à oxidação dos tecidos e do meio de cultura, causado pela liberação dos compostos fenólicos pelos próprios segmentos isolados. A taxa de contaminação foi baixa para a planta 1, cerca de 14%, e nula para a planta 2, mostrando que a assepsia foi eficiente. Porém a eficiência e o tempo utilizado

<sup>4</sup> Necrosamento dos tecidos vegetais do explante causado pela liberação de compostos fenólicos. Causa amarelecimento do meio de cultura.



para a assepsia pode ter influído na forte oxidação ocorrida nos segmentos. Principalmente naqueles da planta 1, cujo broto era maior, onde perdeu-se maior tempo para realizar a introdução *in vitro*. A oxidação ocorreu na faixa de 57% para a planta 1 e 33% para a planta 2.

Os segmentos que restaram da planta 1 foram os de número 1 e 3 e da planta 2 foram os de número 1 e 2. Sendo que destes somente os de número 1 que correspondem ao ponteiro, apresentaram algum crescimento. Porém, devido ao término do período do estágio e da falta de tempo para se deslocar até Bento Gonçalves, após 2 meses, quando realizou-se a troca de meio de cultura, observou-se que somente o segmento de número 2 sobreviveu, sendo que os demais morreram. O que restou, aparentemente, apresentou um pequeno crescimento da gema axilar, sendo portanto transferido para um meio de cultura novo.

**Tabela 7: Taxas de contaminação e oxidação *in vitro* dos segmentos nodais e ponteiros extraídos de plantas de 'Gala' infectadas com ApMV, submetidas à termoterapia.**

| Planta | Extraídos | Contamin. | Oxidação | % contamin | % oxidação |
|--------|-----------|-----------|----------|------------|------------|
| 1      | 7         | 1         | 4        | 14,29      | 57,1       |
| 2      | 3         | 0         | 1        | 0          | 33,33      |





**Figura 20: Forte oxidação, provocando amarelecimento e escurecimento do meio de cultura e explante.**

## **9. CONCLUSÃO PARCIAL DOS EXPERIMENTOS**

Com os experimentos realizados, até o momento, foi possível tirarmos as seguintes conclusões:

### **Em relação ao experimento com meristemas:**

- A taxa de contaminação foi alta para os explantes das plantas de 'Golden' 21 (1-2 mm) e 12 (3-4 mm), 65,8 % e 69,2 % respectivamente, sendo menor para os explantes da planta de 'Gala' 28 (0,5-1 e 2-3 mm), 24,3 e 27,5 % respectivamente.

- Obteve-se um número baixo de plantas regeneradas, sendo que novamente os explantes retirados de ramos da 'Gala' 28 foram os que melhor se regeneraram, proporcionando o aparecimento de eixo caulinar.

- Para ocorrer diferenciação em roseta foliar e eixo caulinar (regeneração) foram necessários 4 meses de cultura *in vitro*.

- A coleta de ramos no final de janeiro prejudicou o andamento do experimento, pois muitos ramos coletados, possuíam gemas apicais e laterais diferenciadas para florescer, impedindo a diferenciação e regeneração de uma planta *in vitro*. Para evitar isso, a melhor época para realizar coleta de material vegetal, seria nos meses de agosto a outubro.

#### **Em relação ao experimento com termoterapia e extração de ponteiros:**

- Obteve-se um bom crescimento das brotações das plantas submetidas à termoterapia durante 25 dias (p1- 14 cm e p2- 4,4 cm). Sendo que isto é muito importante, pois quanto maior a brotação, ou seja, mais rápido o crescimento do broto maior será a chance de eliminação do vírus na parte apical.

- A contaminação não foi baixa, mostrando que a assepsia foi eficaz.

- Ocorreu alta taxa de oxidação dos segmentos isolados, provocando a morte em muitos deles, possibilitando o isolamento de somente 2 segmentos para cada planta.

- Os segmentos permaneceram muito tempo (2 meses) em um mesmo meio de cultura, o que causou a morte de 3 segmentos, restando somente 1. Isto praticamente impossibilita a continuação deste experimento.

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade das mudas de macieira é o principal requisito para obter sucesso em termos de produtividade e qualidade. Somente mudas isentas de vírus possuem o potencial máximo de produção, dependendo assim das práticas utilizadas para que este potencial seja alcançado.

Através do estágio realizado na EMBRAPA/CNPUV, foi possível, mesmo que por literatura, conhecer as principais viroses da macieira para Santa Catarina, bem como seus sintomas, transmissão e forma de controle. Permitindo assim maior familiarização com o assunto.

Ainda através deste foi possível estudar alguns testes realizados para detectar presença de vírus em plantas. O acompanhamento de testes realizados para detectar vírus em videira, através da técnica DAS/ELISA, possibilitou ainda o conhecimento dos passos a serem seguidos, bem como os cuidados a serem tomados para maior eficiência do teste. Por sua vez, estes passos serão utilizados posteriormente para a detecção do ApMV em plantas de macieira.

As técnicas utilizadas para eliminação de vírus em plantas, também foi uma abordagem deste relatório e ponto de estudo durante o estágio. Possibilitou o conhecimento mais aprofundado da Termoterapia e da Cultura de Meristemas, bem como a utilização das duas técnicas aliadas. Através deste estudo realizou-se dois experimentos que poderão permitir a verificação da eliminação de vírus por estas técnicas.

Alguns problemas como época de coleta do material vegetativo infectado, baixo número de mudas infectadas para termoterapia, contaminação e oxidação dos explantes *in vitro*, atrapalharam um pouco o andamento dos experimentos. Porém mesmo assim espera-se a obtenção de resultados finais concretos, os quais possibilitarão maiores conclusões sobre as técnicas utilizadas.

O estágio curricular para muita gente é visto como uma ponte para a obtenção de um emprego, o que não deixa de ser. Mas para mim, a maior importância que vejo nele está na realização pessoal e não profissional, pois através dele é possível conhecer novas pessoas, lugares, idéias, etnias, etc, que só vem a aumentar o conhecimento pessoal. O qual sim poderá ajudar, em muito, na obtenção de um trabalho digno de um agrônomo formado nesta universidade.



## 11. BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, A.M.R. s.d. Detecção e quantificação de vírus pelo método de ELISA. **CNPSo-EMBRAPA**, Londrina, P.R, p.1-18.
- BLEICHER, J.; MELZER, R.; BERTON, O.; BONETI, J.I.S.; DRIESSEN, A.C. 1986. Doenças da macieira. p. 380-442. In **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, 562p ilustr.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.** 34:475-83.
- DAL CONTE, A.F.; HAAS, J.C. 1986. Obtenção de plantas de videira livres de vírus pela termoterapia e multiplicação de matrizes com sanidade comprovada. **EMBRAPA/CNPUV - Secretaria da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul**. p.1-4.
- DANIELS, J. 1994. Métodos imunológicos utilizados na diagnose de doenças de plantas. **Rev. An. Patol. Plant.** 2:53-84.
- EDWARDS, M.L.; COOPER, J.I. 1985. Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. **J. Virol. Meth.** 11:309-19.
- ENGWALL, E.; PERLMANN, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry.** 8:871-874.

- FERNANDEZ VALIELA, M.V. 1969. Introducion a la Fitopatologia. 3 ed. **Coleccion Cientifica INTA**, v.1. Buenos Aires, Argentina. p. 927-931.
- FRIDLUND, P.R. 1989. Thermotherapy. p. 284-295. In **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. ed. P.R Fridlund. Washington State University, Pullman, WA, 330 p.
- FRIDLUND, P.R.; WATERWORTH, H.E. 1989. Apple flat limb. p. 89-93. In **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. ed. P.R Fridlund. Washington State University, Pullman, WA, 330 p.
- LEITE, G.B.; BLEICHER, J. 1993. Viroses e micoplasmoses da macieira no Estado de Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, v.6, 3: 21-24.
- MARTELLI, G.P. 1966. Termoterapia delle virosi: nuovi orientamenti. In: **Estratto da "L' Italia Agricola"**. 103, 5:1-16.
- MENDONÇA, A.A.V. 197-. Tratamentos térmicos da Videira: obtenção de plantas sãs a partir de plantas infectadas por vírus. **Agricultura**. p.5-8.
- MINK, G.I. 1989a. Apple chlorotic leafspot. p.8-19. In **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. ed. P.R Fridlund. Washington State University, Pullman, WA, 330 p.
- , 1989b. Apple mosaic virus. p. 34-39. In **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. ed. P.R Fridlund. Washington State University, Pullman, WA, 330 p.
- OGAWA, J.M. 1991. Diseases of Temperate Zone Tree Fruit and Nut Crops. **University of California**. p. 74-81.

- OHKOSHI, K. 1991. Production of virus-free plants by meristem culture - vegetables and ornamental plants -. **Food & Fertilizer Technology Center, Technical Bulletin** 126: 1-10.
- OUCHTERLONY, O. 1948. In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diptheria bacteria. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** 25:186-91.
- RAMSDELL, D.C. 1989. ELISA. In **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. ed. P.R Fridlund. Washington State University, Pullman, WA, 330 p.
- SEQUEIRA, J.C. 1992. Técnicas serológicas e biomoleculares de diagnóstico de vírus e de viróides em plantas. **Summa Phytopathol.** 18:79-110.
- STOUFFER, R.F. 1989. Apple stem pitting. p. 138-144. In **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. ed. P.R Fridlund. Washington State University, Pullman, WA, 330 p.
- THOMSEN, A. 1989. Green crinckle. p. 55-57. In **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. ed. P.R Fridlund. Washington State University, Pullman, WA, 330 p.
- TORRES, A.C. 1995. Curso de cultura de células e tecidos de plantas. **MAARA/CBAB/CNPH**, Brasília-DF.159 p.
- VAN SLOGTEREN, D.H.M. 1955. Serological analysis of some plant viruses with the gel-diffusion method. In **II Conf. Potato Virus Diseases**. Wageningen, p. 45-50.



- WELSH, M.F.; van der MEER, F.A. 1989. Apple stem grooving. p. 127-136. In **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. ed. P.R Fridlund. Washington State University, Pullman, WA, 330 p.
- YAMAGA, H.; MUNAKATA, T. 1991. Production of virus-free apple planting stock by meristem culture. **Food & Fertilizer Technology Center, Technical Bulletin** 126: 11-17.
- ZIMMERMAM. 1989. Meristem culture. p. 278-281. In **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. ed. P.R Fridlund. Washington State University, Pullman, WA, 330 p.

## **ANEXO I**

### **METODOLOGIA DO TESTE DAS (ELISA)**

#### 1- ANTICORPO (IGG)

- 1.1- Diluir a IgG (Imunoglobulina G) 1000 vezes (1 $\mu$ l/1ml) em Tampão de fixação (Coating).
- 1.2- Distribuir 200  $\mu$ l por célula de placa de microtitulação.
- 1.3- Colocar a placa em câmara úmida (caixa fechada).
- 1.4- Incubar 4 horas à temperatura ambiente ou uma noite à 4°C.
- 1.5- Lavar a placa 3 vezes com o Tampão de lavagem (Washing).

OBS: Em cada lavada, esperar 3 minutos para retirar o Tampão.

#### 2- AMOSTRA

- 2.1- Pesar 1 g de tecido (pecíolo, limbo ou raspa de lenho) para 5 ml de Tampão de extração.
- 2.2- Macerar e filtrar em gase.
- 2.3- Clarificar o suco obtido, através de centrifugação à 1500 rpm por 15 minutos.
- 2.4- Distribuir 200  $\mu$ l por célula da placa.
- 2.5- Incubar durante uma noite à 4°C.
- 2.6- Lavar a placa 3 vezes com Tampão de lavagem.

### 3- CONJUGADO

- 3.1- Diluir 1000 vezes (1 $\mu$ l/1ml) o conjugado em Tampão conjugado.
- 3.2- Adicionar 200  $\mu$ l/célula da placa.
- 3.3- Incubar por 2 horas à 37°C.
- 3.4- Lavar 3 vezes com Tampão de lavagem.

### 4- SUBSTRATO

- 4.1- Dissolver o substrato (0,7 mg/ml) em Tampão substrato.
- 4.2- Distribuir 200  $\mu$ l/célula da placa.
- 4.3- Incubar à 37°C por 30-120 minutos. A reação pode ser paralizada adicionando-se 50  $\mu$ l/célula da placa de uma solução de NaOH 1M (2g NaOH/50ml H<sub>2</sub>O).
- 4.4- Leitura com 405 nm em Espectrofotometro.

### **TAMPÕES:**

**PBS(Fosfato):** em 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,4

NaCl = 8 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0,2 g

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 1,15 g

Hcl = 0,2 g

NaN<sub>3</sub> = 0,2 g para conservar por 3 meses.

**EXTRAÇÃO:** em 1000 ml PBS, pH 7,4

Polyvinylpyrrolidone (PVP) = 20 g

Tween 20 = 0,5 ml



**LAVAGEM:** em 1000 ml PBS, pH 7,4

Tween 20 = 0,5 ml

**FIXAÇÃO:** em 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 9,6

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 1,59 g

NaHCO<sub>3</sub> = 2,93 g

**\*CONJUGADO:** em 1000 ml PBS, pH 7,4

PVP = 20 g

Tween 20 = 0,5 ml

Bovine serum albumin (BSA) = 2 g

**\*SUBSTRATO:** em 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 9,8

Diethanolamine = 97 ml

(\*) Uso imediato

## **ANEXO II**

### **METODOLOGIA DA INOCULAÇÃO DE VÍRUS EM PLANTAS HERBÁCEAS INDICADORAS**

- 1- Pesar 1 g da amostra (folhas, pétalas, casca interna) para 5 ml do Tampão de extração;
- 2- Macerar bem até a amostra ficar líquida e filtrar com gase;
- 3- Centrifugar 15 minutos em 1500 rpm à 4°C.
- 4- Misturar Celite ou Carburundum na proporção de 100 mg/ml de antígeno;
- 5- Esfregar delicadamente sobre as folhas com o auxílio de um cotonete ou mesmo com o dedo;
- 6- Retirar o excesso do antígeno através de lavagem com água destilada;
- 7- Marcar as folhas e acompanhar os sintomas.

#### TAMPÃO DE EXTRAÇÃO:

Composto por 2 soluções:

**Sol. A:** 2,72 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /100 ml de água destilada.

**Sol. B:** 2,84 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /100 ml de água destilada.

Para 50 ml de tampão (0,05 M, pH 7,0) adicionar:

4,88 ml da Sol. A; 7,63 ml da Sol. B; 50 mg de Sulfito de Sódio, 1ml de nicotina e completar com água destilada até 50 ml.